

الجزء
الثاني

علم البكتيريات

التمارين العملية الأساسية

دكتور مصطفى كمال أبو الذهب
دكتور حسين محمد الكشـير
دكتور سيد أحمد القزاز
دكتورة عالية عبد الباقي شـعيب



دارالمعارف

علم البكتيريات

التمارين العملية الأساسية

الجزء الثاني

دكتور مصطفى كمال أبو الذهب
دكتور حسين محمد الكشير
دكتور سيد أحمد القزاز
دكتورة عالية عبد الباقي شعيب

قسم أمراض النبات - كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية

الطبعة الثانية



دار المعارف

بطاقة فهرسة
إعداد الهيئة المصرية العامة لدار الكتب والوثائق القومية
إدارة الشؤون الفنية

أبو الذهب ، مصطفى كمال .
علم البكتريات : التمارين العملية الأساسية .
مصطفى كمال أبو الذهب (وآخ) .
ط ٠٢ - القاهرة : دار المعارف ، ٢٠١١ .
مج ٢ : ٢٤ سم .
تكمك : ٧ - ٧٥٣٢ - ٠٢ - ٩٧٧ - ٩٧٨ .
١ - البكتريا .
١ - العنوان .

ديوى ٥٨٩,٩

رقم الإيداع ٢٠١١ / ٧٢٧٠ ١ / ٢٠١١ / ٢

تنفيذ المتن والغلاف
بقطاع نظم وتكنولوجيا المعلومات
دار المعارف

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مقدمة

اشتمل هذا الكتيب على معظم التمارين الأساسية الضرورية للتدريب المعملى لدارسى علم البكتيرات فى مجالاته المختلفة وذلك إيماناً منا بأن الدراسات المعملية هى الوسيلة الوحيدة للتوسع فى البحث العلمى والذى يعتبر بدوره المصدر الرئيسى للإضافات العلمية الجديدة لفروع العلم المختلفة .

ولاشك أن الإكتشافات العلمية المتنوعة والتى أفادت البشرية فى شتى نواحي الحياه قد جاءت على أيدي من تدربوا تدريباً عملياً جيداً على أسس سليمة واكتسبوا بذلك خبرة أهلتهم للإستمرار فى البحث والتنقيب حتى وصلوا إلى ما وصلوا إليه .

وقد راعينا أن نبين الأسس النظرية وراء كل تمرين قبل سرد خطوات العمل فيه مع مراعاة الإمكانيات المتاحة فى معظم معامل البكتيرات فى الجامعات المصرية والعربية . كما أدرجنا بعض التمارين العملية فى المجالات التطبيقية المختلفة لهذا العلم .

والله نسأل أن يكون هذا الكتيب مؤدياً للغرض الذى نشر من أجله وهو ولى التوفيق .

المؤلفون

الفهرس

الصفحة

ج	مقدمة
٣	تعليمات عامة
٤	الدراسات المجهرية
٤	المجهر ذو الحقل المضيء
١٥	التمرين الأول (الفحص المجهرى للخلايا البكتيرية)
١٦	الدراسات المجهرية بالحقل المظلم
١٧	التمرين الثانى (الصبغ السالب)
١٨	الفحص المجهرى باستعمال الأطوار المثانية
٢٣	التمرين الثالث تشغيل المجهر ذو الأطوار المثانية
٢٤	المجهر ذو الأشعة فوق البنفسجية
٢٥	المجهر الألكترونى
٢٦	التمرين الرابع (تشغيل المجهر الألكترونى)
٢٩	فحص ودراسة حركة البكتيرات
٢٩	التمرين الخامس أ فحص حركة البكتيرات بالشرائح العادية
٣١	التمرين الخامس ب فحص حركة البكتيرات بالنقطة المغلقة
	التمرين الخامس ج فحص حركة البكتيرات بالوخز فى الآجار
٣٣	العميق
٣٤	التمرين السادس أ تحضير الغشاء تهيئة للصبغ
٣٥	الأصباغ المستعملة لصبغ البكتيرات
٣٩	التمرين السادس ب الصبغ البسيط
٤٣	التمرين السابع الصبغ المركب (جرام)
٤٥	التمرين الثامن الصبغ المقاوم للأحماض
٤٦	التمرين التاسع صبغ الغلاف
٤٨	التمرين العاشر صبغ الأسواط

الصفحة

٤٩	التمرين الحادى عشر أ صبغ الجراثيم (طريقة ستافر ، فولتون)
٥٠	التمرين الحادى عشر ب صبغ الجراثيم (طريقة دورنر)
٥١	التمرين الثانى عشر القياسات المجهرية
٥٤	تنمية البكتيريات
٥٨	أنواع بيئات الزرع - انظر الملحق رقم ١ (ص ٢٢٧)
٦١	التمرين الثالث عشر أ تحضير بيئة المرق المغذى
٦٢	التمرين الثالث عشر ب تحضيرية بيئة الآجار المغذى
٦٣	الصفات المزرعية
٦٧	التمرين الرابع عشر فحص المستعمرات
٧٠	التعقيم
٧٠	الطرق الفيزيائية (باستعمال الحرارة)
٨٢	التمرين الخامس عشر أ اختبار كفاءة التعقيم الحرارى حيويًا
٨٣	التمرين الخامس عشر ب اختبار كفاءة التعقيم الحرارى كيميائيا
٨٤	الطرق الفيزيائية (باستعمال الأشعاعات)
٨٦	الطرق الكيماوية
٨٨	الطرق الميكانيكية
٩٥	التمرين السادس عشر اختبار كفاءة طرق التعقيم المختلفة
٩٦	طرق دراسة المزارع النقية
٩٧	التمرين السابع عشر أ طريقة تخطيط الأطباق
١٠١	التمرين السابع عشر ب اختبار كفاءة طرق التخطيط المختلفة
١٠٣	التمرين الثامن عشر طريقة الصب بالأطباق
١٠٥	التقدير الكمي للنمو البكتيرى
١٠٦	التمرين التاسع عشر العد المباشر للخلايا (شريحة نيروف هاوسر)
١٠٧	التمرين العشرين العد المباشر للخلايا (شرائح زجاجية عادية)
١٠٩	التمرين الحادى والعشرون التقدير غير المباشر لعدد الخلايا

الصفحة

- ١١١ التمرين الثانى والعشرون تقدير الوزن الجاف للخلايا
- ١١٢ التمرين الثالث والعشرون تقدير الآزوت الكلى بالخلايا
- ١١٤ التمرين الرابع والعشرون تقدير درجة العكارة
- ١١٥ التمرين الخامس والعشرون تقدير درجة إنتاج الحمض بالمرعة
- ١١٧ التمرين السادس والعشرون عزل وتنمية البكتيروفاجات
- ١١٩ التمرين السابع والعشرون زراعة البكتيروفاجات
- ١٢٢ التمرين الثامن والعشرون تأثير الحرارة على النمو
- ١٢٣ التمرين التاسع والعشرون التأثير المميت للحرارة
- ١٢٦ التمرين الثلاثون أ تأثير الضغط الأسموزى على النمو (ملح الطعام)
- ١٢٦ التمرين الثلاثون ب تأثير الضغط الأسموزى على النمو (سكروز)
- ١٢٨ التمرين الحادى والثلاثون أ تأثير تركيز أيون الأيدروجين على *E. coli*
- التمرين الحادى والثلاثون ب تأثير تركيز أيون الأيدروجين على بكتيريات
مختلفة فى تحملها ١٣٠
- ١٣١ التمرين الثانى والثلاثون طريقة تقدير الاحتياجات الأكسوجينية (آجار عميق)
- التمرين الثالث والثلاثون طريقة تقدير الاحتياجات الأكسوجينية (أنبوبة
رايت) ١٣٢
- التمرين الرابع والثلاثون طريقة تقدير الاحتياجات الأكسوجينية (مرق
النيوجيكولات) ١٣٣
- ١٣٦ التمرين الخامس والثلاثون تأثير الأشعاع (الأشعة فوق البنفسجية)
- ١٣٨ التمرين السادس والثلاثون تأثير الجفاف
- ١٣٩ التمرين السابع والثلاثون تأثير التوتر السطحي
- التمرين الثامن والثلاثون تأثير المعادن الثقيلة (عملة نحاسية أو
برنزىة) ١٤٠
- ١٤١ التمرين التاسع والثلاثون تأثير الصبغات (الكريستال البنفسجى)
- ١٤٣ التمرين الأربعون التضاد الطبيعى بكتيريات ضد بعضها
- ١٤٤ التمرين الحادى والأربعون التضاد الطبيعى فطر ضد بكتيريا

- التمرين الثانى والأربعون التضاد الصناعى (أقراص ورق ترشيح بها مضادات حيوية) ١٤٦
- التمرين الثالث والأربعون تحليل النشا ١٤٩
- التمرين الرابع والأربعون تحليل السليلوز (تحت ظروف هوائية) ١٥١
- التمرين الخامس والأربعون تحليل السليلوز (تحت ظروف غير هوائية) ١٥٢
- التمرين السادس والأربعون تحليل الجيلاتين ١٥٣
- التمرين السابع والأربعون تحليل الكازين ١٥٤
- التمرين الثامن والأربعون تحليل الدهون ١٥٥
- التمرين التاسع والأربعون إنتاج كبريتوز الأيدروجين ١٥٧
- التمرين الخمسون تحليل الأحماض الأمينية الحلقية (تریتوفان) ١٥٩
- التمرين الحادى والخمسون تحليل الأحماض الأمينية الحلقية (الفنيل الأئینی) ١٦٠
- التمرين الثانى والخمسون تحليل الأحماض الأمينية الحلقية (الأرجنين) ١٦٠
- التمرين الثالث والخمسون الكشف عن الأنزيمات المزيلة للكربوكسيل ١٦١
- التمرين الرابع والخمسون التغيرات التى تحدثها الأحياء الدقيقة فى لبن عباد الشمس ١٦٣
- التمرين الخامس والخمسون اختبار إنتاج أنزيمات الأوكسيداز ١٦٥
- التمرين السادس والخمسون اختبار إنتاج أنزيمات الأيهيدورجياز (اختبار أزرق الميثيلين) ١٦٦
- التمرين السابع والخمسون اختبار أنزيم الكاتليز ١٦٨
- التمرين الثامن والخمسون اختبار اختزال التترات ١٦٩
- التمرين التاسع والخمسون اختبار تخمر الكربوايدرات ١٧٠
- التمرين الستون اختبار أحمر الميثيل ١٧٣
- التمرين الحادى والستون اختبار تكوين حمض البيوتيريك ١٧٤
- التمرين الثانى والستون اختبار تكوين كحول الايثايل ١٧٤

١٧٥	التمرين الثالث والستون اختبار تحليل الاسكيولين
١٧٥	التمرين الرابع والستون اختبار مواد مختزلة من السكروز
١٧٦	التمرين الخامس والستون تحضير بيئة للكشف عن ٢ - كيتوجلو كونات
١٧٦	التمرين السادس والستون اختبار إنتاج ٢ - كيتوجلو كونات
١٧٦	التمرين السابع والستون اختبار إنتاج الليفان
١٧٧	التعرف على الأنواع البكتيرية
١٧٨	استعمال مرجع ييرجى
١٩٢	التطفر
١٩٣	التمرين الثامن والستون الحصول على مستعمرات صغيرة جدًا
١٩٤	التمرين التاسع والستون عزل الطفرات المختلفة فى الصفات المزرعية
١٩٦	التمرين السبعون عزل الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية
١٩٨	التمرين الحادى والسبعون عزل الطفرات المختلفة فى قدراتها المرضية
٢٠١	تجارب فى البكتريولوجيا التطبيقية
٢٠١	أولاً : بكتريولوجيا الألبان
٢٠١	التمرين الثانى والسبعون أخذ عينات من اللبن للفحص الميكروبي
٢٠٢	التمرين الثالث والسبعون العد القياسى للبكتيريا فى العينات (طريقة الأطباق)
٢٠٢	التمرين الرابع والسبعون العد القياسى للبكتيريا فى العينات (العد المجهرى)
٢٠٣	التمرين الخامس والسبعون تقدير درجة نظافة اللبن (اختبار أزرق الميثيلين)
٢٠٤	التمرين السادس والسبعون تقدير درجة نظافة اللبن (اختبار أختزال الرسازورين)
٢٠٥	التمرين السابع والسبعون تقدير محتويات القشدة فى الخمائر والفطريات
٢٠٦	التمرين الثامن والسبعون للفحص الميكروبي للزبد
٢٠٦	التمرين التاسع والسبعون أ تقدير تعداد الخمائر والفطريات فى الزبد
٢٠٦	التمرين التاسع والسبعون ب عد البكتيرات فى المزبد
٢٠٧	التمرين الثمانون تقييم الباداتات

الصفحة

- ٢٠٨ التمرين الحادى والثمانون دراسة بكتيريات حمض اللاكتيك
- ٢٠٩ ثانيًا : بكتيريولوجيا الأغذية
- ٢٠٩ البيض ومنتجاته
- ٢٠٩ التمرين الثانى والثمانون فحص محتويات البيض الكامل
- ٢٠٩ اللحوم ومنتجاتها
- ٢٠٩ التمرين الثالث والثمانون أخذ العينات
- ٢١٠ التمرين الرابع والثمانون العد الكلى للبكتيريات
- ٢١٠ التمرين الخامس والثمانون العد الكلى للخمائر والفطريات
- ٢١٠ الدواجن
- ٢١١ التمرين السادس والثمانون العد الميكروبى فى ١ سم^٢ من سطح الدجاجة
- ٢١١ الأغذية المعلبة
- ٢١٢ التمرين السابع والثمانون الكشف عن بكتيريات غير هوائية فى المعلبات
- ٢١٣ التسمم الغذائى
- ٢١٣ التمرين الثامن والثمانون التسمم الناتج عن الكلوستريديات
- ٢١٤ التمرين التاسع والثمانون التسمم الناتج عن الأستفيلوكوكاى
- ٢١٤ التمرين التسعون التسمم الناتج عن السلمونلات
- ٢١٥ ثالثًا : بكتيريولوجيا الأراضى
- ٢١٥ التمرين الحادى والتسعون أخذ عينات التربة للتحليل البكتيريولوجى
- ٢١٦ التمرين الثانى والتسعون تقدير تعداد البكتيريات (العد المباشر)
- ٢١٦ التمرين الثالث والتسعون تقدير تعداد البكتيريات الهوائية (العد بالأطباق)
- ٢١٦ التمرين الرابع والتسعون تقدير تعداد البكتيريات الهوائية المتجربة (العد بالأطباق)
- ٢١٧ التمرين الخامس والتسعون تقدير تعداد البكتيريات اللاهوائية (العد بالأطباق)
- ٢١٧ التمرين السادس والتسعون عزل البكتيريات من العقد الجذرية
- ٢١٨ التمرين السابع والتسعون اختبار أخترال الترات بعينات الأرض
- ٢١٩

الصفحة

٢١٩	التمرين الثامن والتسعون اختبار وجود النشادر بالأرض
٢٢٠	التمرين التاسع والتسعون اختبار وجود الأزوتيت بالأرض
٢٢٠	التمرين المائة اختبار وجود النترا بالأرض
٢٢١	التمرين الحادى بعد المائة التقدير الحوى لمحتويات الأرض من البوتاسيوم
٢٢٢	رابعاً : بكتريولوجيا المياه
٢٢٢	التمرين الثانى بعد المائة العد الكلى للبكتريات
٢٢٣	التمرين الثالث بعد المائة الاختبار التخمينى لبكتيرة القولون
٢٢٣	التمرين الرابع بعد المائة الاختبار التأكيدي لبكتيرة القولون
٢٢٤	التمرين الخامس بعد المائة الاختبار التكميلى لبكتيرة القولون
٢٢٥	خامساً : البكتريولوجيا النباتية
٢٢٥	التمرين السادس بعد المائة التعرف على بعض أعراض الأمراض البكتيرية
٢٢٦	التمرين السابع بعد المائة عزل بكتيرية الطرى
٢٢٧	التمرين الثامن بعد المائة عزل بكتيرة اللقمة النارية فى الكمثرى
٢٢٨	التمرين التاسع بعد المائة عزل بكتيرة التدرن الفاجى
٢٢٩	التمرين العاشر بعد المائة عزل بكتيرة العفن البنى فى البطاطس
٢٣٠	ملحق ١ البيئات الغذائية
٢٤٠	ملحق ٢ الصبغات والمحاليل التى تستعمل فى طرق الصبغ المختلفة
٢٤٥	ملحق ٣ المحاليل •
٢٤٨	المراجع

للمؤلفين

علم

البكتيرات

فانك

الجزء الأول

دكتور مصطفى كمال أبو الرهب

دكتور حسين محمد الكشير

دكتور سيد أحمد القزاز

دكتورة عالية عبد الباقي شحيب



دار المعارف

تعليمات عامة

لما كان الطالب المقدم على التدريب العملى سيتعامل مع كائنات حية غير مرئية لعينه مجردة فكان عليه أن يتبع مجموعة من الإحتياطات التى قد تكون جديدة عليه ليس فقط للحصول على المران الكافى بل أيضاً لحماية نفسه وحماية الآخرين من أخطار هذه الكائنات . فعلى الدارس أن يفترض أن كل البكتيرات التى سيتعامل معها ضارة ومسببة أمراض للإنسان ولو أن معظمها ليس كذلك .

وفيما يلى بعض التعليمات العامة للدراسات المعملية :-

- ١- يجب إرتداء معطف معملى نظيف أثناء العمل بالمعمل وهذا لا يحمى فقط ملابسك من التلوث المتوقع من البكتيرات بل يحميها أيضاً من التلطيخ بالصبغات التى تستعمل يومياً . وعند الإنتهاء من العمل يخلع المعطف ويحفظ فى مكان آمن .
- ٢- يجب ترك الأمتعة الخاصة والكتب غير اللازمة للدراسة بالمعمل فى المكان المخصص لذلك خارج المعمل .
- ٣- قبل بدء العمل يجب تنظيف سطح منضدة العمل جيداً بمحلول مطهر يوفر لك بالمعمل، وهذا سوف يقلل من فرص التلوث لمزارع البكتيرات التى تتعامل معها . ولكى تؤدى خدمة للدارس الذى سيعمل فى مكانك بعد مغادرتك ، أعد تنظيف سطح المنضدة بعد إنتهاءك من العمل بنفس المطهر .
- ٤- يراعى أن تقلل مساحة المنضدة التى تعمل عليها وعدم زحمها بالأدوات وما لا يحتاج إليه مثل الكتب والشنط وغيرها .
- ٥ - ممنوع تناول الأطعمة من أى نوع وكذلك ممنوع التدخين ويجب أن تتعود أن تبعد يديك بقدر الإمكان عن وجهك وخاصة عينيك . وأن لا تلتصق البطاقات المصمغة بلسانك بل يجب أن تستعمل الماء فى ذلك .
- ٦- ضع المزارع القديمة والمستغنى عنها على حامل خاص بذلك حتى يمكن التخلص منها بالتعقيم بالأوتوكلاف - ولا يحتفظ بها على الإطلاق .
- ٧- على الدارس أن يعيد كل شىء لمكانه الذى وجده عليه عند بدء التمرين .
- ٨ - إذا كسرت أنابيب أو دوارق بها مزارع بكتيرات ونثرت على الأرض يجب إبلاغ المسئولين عن المعمل فوراً حتى يقوموا بالإجراءات التعقيم اللازمة .

الدراسات المجهرية

Microscopy

هناك أنواع عديدة من المجاهر وكل نوع له إمكانياته وحدوده وليس هناك مجهرأ يؤدي كل الأغراض بكفاءة عالية. والأنواع الأساسية هي مجاهر الحقل المضيء، وتباين الأطوار والمجاهر الفلورسنتية والمجاهر الإلكترونية. وحيث أن مجهر الحقل المضيء ومجهر تباين الأطوار هي أكثر المجاهر إستعمالاً في مجال علم البكتيرات لذا فقد أدرجنا بهذا الكتيب تمارين خاصة بهما والأسس النظرية لإستعمالاتها في فحص وقياس أحجام الخلايا.

المجهر ذو الحقل المضيء

إن المجهر الذي يسمح بمرور الأشعة الضوئية خلاله لتصل إلى العين دون أن يتعرض لها أى جسم معتم في المكثف الخاص به يعرف بالمجهر ذو الحقل المضيء. وهذا المجهر هو المستعمل بكثرة بواسطة دارسى علوم الحياة على إختلافها وهو أول أنواع المجاهر التى أستعملت بالمعامل البيولوجية وكل أنواع هذا المجهر تشترك في مكوناتها ولكنها قد تختلف فقط في ميكانيكية تشغيلها.

الإضاءة

معظم المجاهر الحديثة مزودة بمصباح كهربائى يزودها بالضوء اللازم، والمجاهر القديمة تحتوى على مرآة تحت الحقل المجهرى لعكس الضوء الصادر من أشعة الشمس أو من مصباح كهربائى متنقل يوضع أمام المرآة.

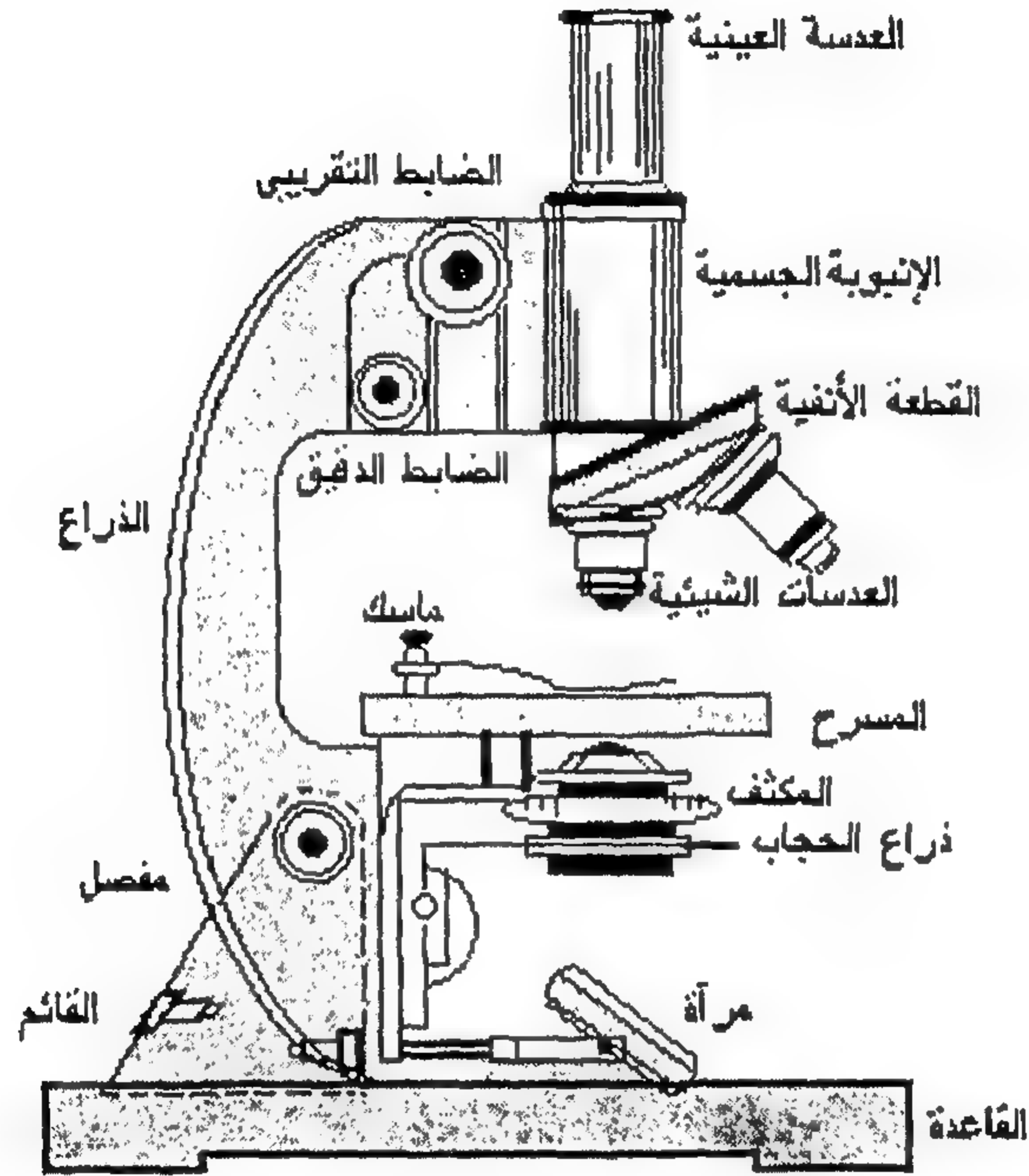
وعادة تكون المرآة ذات سطح مستوى من جانب وآخر مقعر من الجانب الآخر . والسطح المستوى يستعمل فقط إذا كان المجهر يمتلك مكثف ضوئى والعكس صحيح إذا لم يكن للمجهر مكثف . والسبب فى ذلك أن المكثف الضوئى الملحق بالميكروسكوب يستقبل الأشعة المتوازية التى توفرها المرآة المستوية السطح أما عند غياب المكثف فإن إستعمال المرآة المقعرة يركز الضوء على الشريحة المحتوية على المادة المفحوصة . إلا أنه فى المجهر ذو الإضاءة الذاتية والذى ليس له مرآة فإن المصباح الملحق به يمكنه أن يوفر مستويات مختلفة من الإضاءة عن طريق تغير درجة الفولت ويراعى أن كمية الضوء المستعملة تكون عادة قليلة حيث أن الصمام الذى يستعمل ذو قوة ٤ فولت فقط وهذا يؤدى الغرض بكفاءة، يمكنه أن يستمر مدة طويلة إذا ما روعى إستعمال درجة منخفضة من الفولت . وعند إستعمال المجهر ذو الحقل المضىء يفضل فتح الحجاب diaphragm على آخره قبل زيادة كمية الضوء .

مكونات المجهر ذو الحقل المضىء

قبل أن نذكر طريقة تشغيل المجهر يجب أن نتعرف أولاً على أجزاءه المختلفة فى الشكل (١) يبين مجهر ضوئى مركب يتركب من الآتى الذراع Arm والقاعدة Base ومرآه يمكن استبدالها بمصدر كهربى . واللمبة فى هذا المجهر لها يد متحرك لتتحكم فى شدة الإضاءة ومزوده بمكان تسمح بوضع أى نوع من الفلاتر التى تنقى الضوء الصادر من الللمبة وتقلل من شدة الإضاءة وهذه الفلاتر يجب أن تزال تماماً إذا ما استعمل المجهر للحصول على أقصى تكبير له .

ونعود مرة أخرى لسرد باقى أجزاء المجهر فنجد المسرح المجهرى Stage وهو المكان الذى توضع فوقه الشريحة .

وهناك مجاهر ذات مسارح ثابتة وأخرى ذات مسارح متحركة ميكانيكياً mechanical stages ذات سطح علوى يسمح بتسكين الشريحة وتثبيتها فى مكانها كما يسمح تحريك المسرح نفسه بما عليه من شريحة فى جميع الإتجاهات بالإستعانة بمفاتيح ملحقين به وهذه المفاتيح إما تكون أسفل المسرح أو أعلاه .



شكل (١) الميكروسكوب الضوئى - ميكروسكوب مركب .

وتحت المسرح مباشرة نجد مجموعة من العدسات تكون ما يعرف بالمكثف والسابق الإشارة إليه . وهذا المكثف يعمل على تجميع الأشعة الضوئية على سطح الشريحة . ويمكن تحريك المكثف إلى أعلى وإلى أسفل باستعمال المفاتيح الخاصة بذلك الموجودة تحت المسرح أيضاً ، وللاستعمال المثالى للمجهر يستحسن أن يكون المكثف فى أقصى إرتفاع له ونادراً ما يضطر الفاحص إلى

خفضه قليلاً لأسفل • وتحت المكثف مباشرة نجد الحجاب diaphragm وهو يتحكم فى كمية الضوء التى تمر خلال المكثف وله يد يمكن بواسطتها قفله أو فتحه بالدرجة اللازمة وهو يشبه الحجاب الموجود خلف عدسات كاميرات التصوير الفوتوغرافى •

والعدسات الأولية للمجهر هى الشيئيات Objectives وهى الموجودة على الطرف السفلى من الأنبوبة المجهرية وهى مثبتة بجزء دائرى يتحرك دائرياً أيضاً يعرف بالجزء الأنفى nose piece • وأقصر العدسات تعرف بالقوة الصغرى Low power objective ويوجد عليها قراءة (10X) وأطول الشيئيات يوجد عليها قراءة (100X) وهذه العدسة تعرف أيضاً بالعدسة الزيتية Oil immersion objective وذلك لأنها تتطلب عند إستعمالها غمرها فى كمية قليلة من نوع معين من الزيت يعرف بزيت السيدر والذى يتميز بمعامل إنكسار (١,٥١٥٠) وهذا يشابه معامل إنكسار الضوء للزجاج والعدسة الوسطى تعرف بالعدسة الكبرى الجافة high dry objective ومكتوب عليها 40X • وهناك مجاهر تحتوى القطعة الأنفية منها على أكثر من ثلاث شيئيات و ذات قوى تكبير مختلفة • أما العينيات Ocular lenzes فقوتها عادة 10X وأحياناً 15X •

وعلى جانب المجهر نجد مفتاحين دائرين ذات حافة مشرشرة أحدهما كبير ويعرف بالمعدل التقريبى Coarse adjuster والآخر أصغر حجماً يعرف بالمقرب الدقيق fine adjuster وهما يستخدمان لخفض أو رفع الأنبوبة المجهرية لإيضاح الصورة المرئية ووضعها فى مكانها البورى الواضح focusing •

طريقة الفحص بالعدسة المغمورة فى الزيت :-

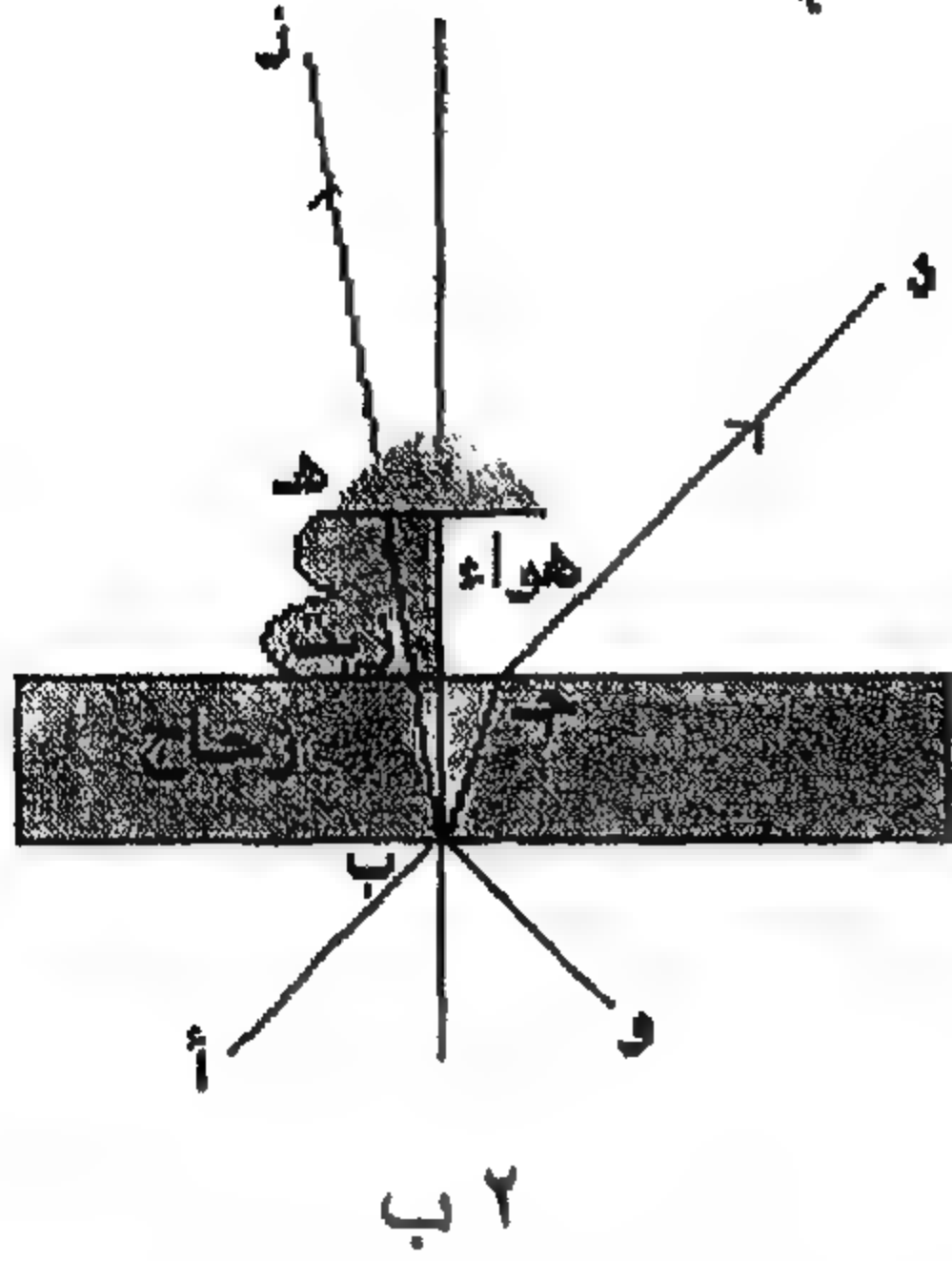
إن كل الدراسات المجهرية البكتيريولوجية وكذلك بعض الدراسات المجهرية لإختبارات الدم تتطلب إستعمال الشيئية المغمورة فى الزيت

(100X) والصعوبة في استعمال هذه العدسة تتمثل في القصر المتناهي لمسافة العمل working distance - الخاص بهذه العدسة فهي تعمل وهي قريبة جداً من الشريحة ومتوسط مسافة العمل هذه تصل إلى ١٤، من المليمتر وصغر هذه المسافة ، من مميزات زيادة القدرة الأيضاحية لهذه العدسة علاوة على أنه ضروري لضمان بقاء الزيت ملتصقاً بكل من العدسة والشريحة ، وفائدة وضع نقطة الزيت فوق الشريحة هو زيادة قيمة الفتحة العددية للشريحة كما سيأتي إيضاحه فيما بعد .

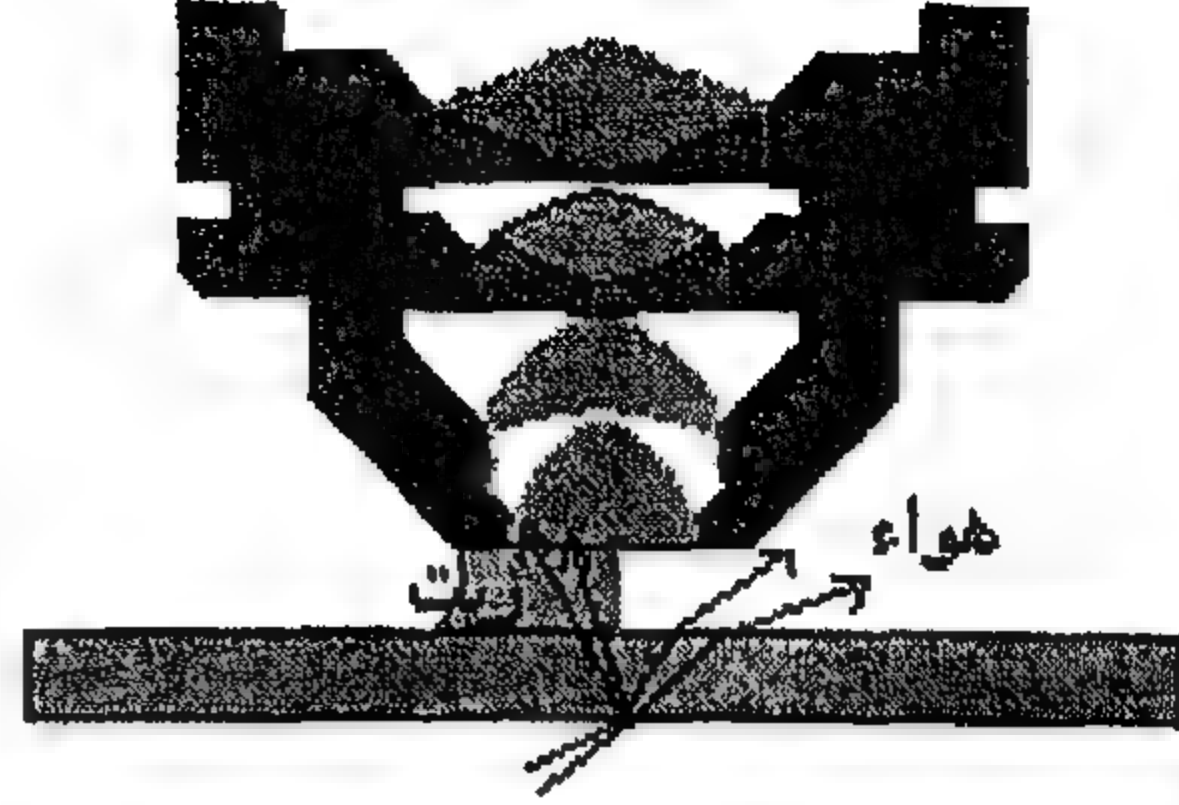
يلاحظ في شكل (٢أ،ب) أن وجود الزيت ذو معامل الإنكسار المساوي لمعامل إنكسار الزجاج يعمل على دخول أكبر كمية من الأشعة الضوئية داخل فتحه العدسة الضيق ولا يفقد منه شيئاً ، ولإستعمال هذه الطريقة يوضع نقطه من زيت السيدر فوق الشريحة ثم نبداً الفحص أولاً بإستعمال الشيئية الصغرى ونحاول أن نضع الجسم المرئى فى مجال بؤرتها ثم نحرك القطعه الانفيه إلى الشيئية الكبرى الجافة ويضبط مجال بؤرتها أيضاً ثم ننقل بعد ذلك إلى العدسة الزيتية و التى ستتغمر فى الزيت لصغر مسافه عملها - يراعى عدم تلويث العدسات الأخرى بالزيت وأحياناً يمكن للباحث المدرب أن يعمل بالعدسة الزيتية مباشرة دون التدرج إليها خلال الشيئيات الأخرى .

التكبير : Magnification

هو العلاقة بين طول أى جزء من الصورة وطول الجزء المماثل له فى الجسم المرئى عندما تكون الصورة والجسم فى أقرب نقطة لوضوح الرؤية لعين الإنسان . إن الأنبوبة الميكروسكوبية تكون عادة ذات طول قياسى هو ١٦٠سم إلا أنه فى بعض الميكروسكوبات يمكن زيادة طول الأنبوبة عن القيمة المذكورة لغرض زيادة التكبير وتعرف هذه الميكروسكوبات بأشتمالها على أنبوبة للسحب Draw tube .



٢ ب



٢ أ

شكل ٢ أ، ب: رسم تخطيطي يبين مسار الأشعة خلال عدسة جافة (الى اليمين) وخلال عدسة زيتية (الى اليسار) لاحظ إنكسار الشعاع الضوئي المائل أ ب ج د خلال مرورة من زجاج الشريحة الى الهواء مع مقارنة بالشعاع و ب هـ ز الذي يمر الى فتحة العدسة الزيتية بدون حدوث إنكسار خلال زيت السيدر.

والتكبير النهائي للميكروسكوب كما هو معروف هو حاصل ضرب تكبير الشيئية في تكبير العينية إذا ما ثبت طول الأنبوبة الميكروسكوبية. ويلاحظ أنه في بعض الميكروسكوبات قد تكون الأنبوبة قطعة واحدة ثابتة أو قد يكون بداخلها أنبوب آخر هو أنبوب السحب يمكن سحبه لأعلى وبتحريكة يمكن تغير المسافة بين العينية والشيئية فإذا زاد طول الأنبوبة عن ١٦٠ مم حتى يصل الى ٢٠٠ مم مثلاً فإن قوة تكبير الشيئية تزداد بمعدل ١٦٠/٤٠ أى أنها تزيد الى واحد وربع مرة عما كانت عليه وبالتالي يزداد التكبير الكلى ويرمز الى عدد مرات تكبير العدسة للجسم المرئى بعلامة (x) ولكل شيئية أو عينية قوة تكبير خاصة بها تكون مرقومة على سطحها الخارجى بجانب العلامة المذكورة.

وتتراوح قوة تكبير الشبثيات بين ٥, ٢ × ، ١٠٠ × ، وفي العينيات بين ٤ × و ٣٥ × .

ويلاحظ أنه يمكن زيادة درجة التكبير Degree of magnification بإستعمال عينيات أو شبثيات متزايدة القوة أو كما سبق ذكره بزيادة طول الأنبوبة ، وبالرغم من أن قوة التكبير للميكروسكوب تزداد بهذه الطريقة إلا أن درجة التفصيل (قوة التمييز) Resolution التي يمكن مشاهدتها لا تتغير حيث أنها تتحدد بطول موجة الضوء المستعمل والعدسة الشبثية المستعملة .

طول الموجة الضوئية :

تختلف أطوال الموجات الضوئية المكونة للمجال الضوئي المرئي وهو المجال المستعمل في الميكروسكوب الضوئي والتي تتراوح بين (٤٠٠٠) أ (A⁰) و (٧٠٠٠) أ .

أما عند إستعمال موجات يقل طولها عن ذلك فتستعمل ميكروسكوبات أخرى مثل ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية Ultra - violet microscope والذي يستعمل الموجات فوق البنفسجية التي يتراوح طولها بين ٣٠٠٠ و ١٠٠٠ A⁰ ، وميكروسكوب أشعة Ray X والذي يستعمل أشعة X التي يتراوح طولها بين ١٠٠ و ١٠ A⁰ ، والميكروسكوب الإلكتروني Electron- microscope والذي يستعمل الأشعة الإلكترونية التي طولها ٠,١ A⁰ أو أقل ، وعند إستعمال

الأنجستروم = ١٠^{-٧} من المليمتر .
مكرون (μ) = ١٠^{-٦} nm نانوميتر .

١ = أنجستروم (A⁰) Angstrom
المليمتر = ١٠^{-٣} ميكرون (μ) .
مكرون (μ) = ١٠^{-٤} A⁰

ضوء غير مرئى تلتقط صورة الجزء المفحوص على لوح حساس يحمض
وتطبع الصورة المتكونة عليه بعد تكبيرها تكبيراً مناسباً.

الشيئيات وقوة التفصيل (قوة التمييز) :

الشيئية عبارة عن عدسة مركبة (عدستين أو أكثر) ، وهى الجزء
الأساسى من الميكروسكوب وتتخلص وظائفها فى الآتى:

١- تستقبل الأشعة الضوئية الآتية من أى نقطة من العينة المفحوصة
وتكون لها صورة كما سبق أن وضحنا .

٢- التكبير : قد يتعجب الطالب لماذا لاتصمم ميكروسكوبات ضوئية ذات
قوة تكبيرية أكبر مما يشاهده فى المعمل؟ والسبب فى ذلك أن المشكلة ليست فى
قوة التكبير بل فى قوة التفصيل (قوة التمييز) Resolving power الخاصة بالشيئية
أو بمعنى آخر قدرة الشيئية على أن تكون صوراً منفصلة عن بعضها لنقط أو
أجزاء صغيرة متقاربة من بعضها بشكل صور منفصلة غير متراكبة فوق
بعضها وهذه الخاصية تحدد التفاصيل البنائية التى يمكن مشاهدتها ميكروسكوبياً .
وقوة التفصيل (قوة التمييز) هذه تتحدد بطول الموجة الضوئية (λ)
وقيمة الفتحة العددية (NA) Numerical aperture للشيئية ، وهذه العلاقة يمكن
التعبير عنها بالمعادلة الآتية :

$$\text{قوة التفصيل (قوة التمييز)} = \frac{\text{طول الموجة الضوئية}}{2 \times \text{الفتحة العددية}}$$

$$\text{Resolving power} = \frac{\lambda}{2 \times \text{NA}}$$

وتقدر الفتحة العددية NA للعدسة بالمعادلة الآتية :

محدودة نتيجة لأن قيم الفتحة العددية للشبكات وطول الموجة الضوئية للضوء المنظور أو المرئي هي قيم محدودة .

وعلى ذلك فإنه يلزم لرؤية الاجسام الدقيقة الحجم منفصلة بعضها عن بعض بإستعمال أقل طول موجة ضوئية من الضوء المنظور وشيئية لها أقصى فتحة عددية ممكنة . فمثلاً الشبكية المغموسة في الزيت لها فتحة عددية قيمتها ١,٢٥ وأن الضوء الأخضر -الذي تكون العين أكثر حساسية له -له طول موجة ٥٠٠٠ أنجستروم أو ٥٠٠ nm . وبتطبيق هذه القيم في معادلة حساب قوة التفصيل (التمييز) :

$$\frac{500}{2 \times 1,25} = \text{قوة التفصيل (قوة التمييز)}$$

$$nm \ 200 =$$

$$= 2,2 \text{ ميكرون} .$$

$$= 2000 \text{ أنجستروم} .$$

ومن ذلك يتضح لنا أن أصغر جسم يمكن تمييزه بوضوح بالميكروسكوب الضوئي يجب أن لا يقل قطره عن ٢,٢ ميكروناً تقريباً .
ويلاحظ أن العين لا تستطيع أن تميز بين أجسام تبعد عن بعضها مسافة تقل عن ٢٠٠ ميكرون (أي ٢,٢ من المليمتر) ولا تستطيع أن ترى أجساماً يقل قطرها عن ذلك أيضاً ولذلك فإنه يجب تكبير الصورة التي تكونها الشبكية في المجهر المركب حتى تستطيع أن تراها منفصلة عن بعضها، فمثلاً إذا كانت قوة تفصيل (تمييز) عدسة شبكية ٢,٢ . ميكرون فلكي تستطيع عين الفاحص أن ترى هذا التفصيل يجب أن يكون التكبير الكلي للميكروسكوب ١٠٠٠ مرة بحيث تكبر مسافة الـ ٢,٢ ميكرون إلى ٢٠٠ ميكرون .

ومما تقدم نعتقد أنا نستطيع الآن أن نقنع من يتساءل لماذا لا تصنع ميكروسكوبات ضوئية ذات قوة تكبيرية أعلى من المتوفر حالياً فإذا فرضنا حدوث ذلك فإن التكبير الناتج لا يصاحبه أى تفصيل (تمييز) ويكون تكبير عديم القيمة من حيث الكشف عن التركيب الدقيق للجسم ويطلق عليه تكبير أجوف Empty magnification وبذلك فإن التكبير والتفصيل مكملان لبعضهما ، فتكبير بدون تمييز هو تكبير أجوف لا يكشف عن تفاصيل جديدة كما أن تمييزاً بدون تكبير كاف لا تستطيع العين أن تراه .

وبالرجوع إلى معادلة قوة التفصيل السابقة يظهر لنا أن قوة التفصيل (التمييز) للعدسة تزداد كلما قصر طول الموجة الضوئية المستعملة، فبينما تكون أصغر مسافة يمكن تمييزها بين جسمين صغيرين منفصلين ومتجاورين يمكن للميكروسكوب الضوئي المركب تمييزها هي مسافة ٠.٢ ميكرون فإنها تكون مع ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية = ٠.١ ميكرون وبالميكروسكوب الإلكتروني = ٠.٠٠٠١ ميكرون .

البعد البؤرى المكافئ : Equivalent Focus Length

يقدر لكل عدسة بسيطة بعداً بؤرياً Focal length خاصاً بها ونظراً لأن العدسة الشبكية هي عبارة عن عدسة مركبة تتكون من عدد من العدسات فإنه توجد لها بعداً بؤرياً خاصاً يعبر عنه بالبعد البؤرى المكافئ ، وهو يقدر بالبعد البؤرى النظرى لعدسة بسيطة لها نفس قوة تكبير الشبكية المركبة ، ويقدر البعد البؤرى المكافئ بالمليمتر أو بالبوصة . وعموماً فى حالة تساوى عدستين فى البعد البؤرى فإنه يفضل ذات الفتحة العددية NA المرتفعة على الأخرى ذات الفتحة العددية المنخفضة . وعموماً فإن الشبكية ١٦ مم (أى بعدها البؤرى المكافئ = ١٦ مم) تكون ذات فتحة عددية = ٠.٢٨ ، والشبكية ٤ مم (بعدها

البؤرى المكافىء ٤مم) تكون ذات فتحة عددية = ٦٥.٠٠ ، والشئية ٢مم (بعدها
البؤرى المكافىء ٢مم) تكون قيمة الفتحة العددية لها ٢٥ , ١ .

مسافة الفحص : Working Distance

هى المسافة بين مقدمة الشئية والسطح العلوى للجسم (فى حالة عدم استعمال غطاء شريحة) أو المسافة بين مقدمة الشئية والسطح العلوى لغطاء الشريحة (عند استعمال غطاء الشريحة) . فإذا كان غطاء الشريحة أسمك من مسافة الفحص للشئية فإن من المستحيل مشاهدة الجسم المغطى متبؤراً In focus وكلما زادت قوة تكبير الشئية كلما قلت مسافة الفحص ولزم استعمال أغطية للشرائح رقيقة وعادة يكتب سمك غطاء الشريحة الذى يمكن استعماله مع الشئيات المرتفعة القوة على سطحها المعدنى .

التمرين الاول

- ١ - افحص اجزاء المجهر التى امامك وتعرف عليها .
- ٢ - ضع نقطه من زيت السيدر على الشريحة المجهزه التى امامك .
- ٣- افحص الخلايا باستعمال العدسه الزيتيه بالطريقه السابق وصفها .

الدراسات المجهرية بالحقل المظلم

إن هذه الطريقة تمكن من رؤية الأجزاء المفحوصة مضيئة في حين أن باقى الشريحة تكون مظلمة تماماً ويمكن الحصول على هذا التأثير بتزويد المجهر الضوئى بنوع معين من المكثفات يمكنها توجيه الضوء الصادر من مصدر الإضاءة بعيداً عن الشئئية وأنه لا يصل إلى فتحتها إلا الأشعة التى تصطدم فقط بالأجسام أو الأشياء الموجودة فى وسط متجانس - أى الأجسام المراد فحصها - ويدخول الضوء المبعثر خلال الشئئية. يؤدي ذلك إلى ظهور الأجسام العالقة بحالة مضيئة وسط حقل غير مضيء (مظلم) وتتبع هذه الطريقة فى فحص الخلايا غير المصبوغة والعالقة فى نقطة من البيئة.

ويمكن تقليد هذه الطريقة إن لم يتوفر المكثف الخاص بالحقل المظلم بإتباع طريقة الصبغ السالب Negative stain وفى هذه الطريقة تخلط خلايا البكتيريات بمعلق من الفضة الغروية والمعروف بالكلارجول Collargol أو الحبر الصينى China ink أو محلول النيجروسين Nigrosin ويفرد المخلوط على الشريحة بشكل غشاء رقيق ثم يترك ليجف فى الهواء . فإن جزيئات الصبغه سوف تتكدس حول الخلايا البكتيرية التى تظل شفافة واضحة فى وسط أسود اللون من جيببات الصبغه . وتعرف هذه الطريقة بالصبغ السالب حيث أن الخلايا البكتيرية لاتتخذ أى لون بل أن الوسط المحيط بها هو الذى يتخذ اللون الاسود الداكن .

ويمكن بواسطه هذه الطريقه دراسه الشكل الظاهرى للخلايا البكتيرية دون تعريضها لمعاملات حراريه أو كيمياويه قد تؤثر على شكلها العام . كما أنه بواسطه الصبغ السالب يمكن مشاهدته البكتيريات التى يصعب صبغها بالطرق العاديه وخاصه أفراد الجنس Spirocheata .

التمرين الثانى

١- حضر مزارع حديثة من:

Corynebacterium fascian , *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* ,
E. coli , *Saccharomyces cerevisiae*

٢- ضع نقطة من معلق النيجروسين على شريحة زجاجية نظيفة.

٣- لمس النمو البكتيرى على الآجار بالمزرعة المستعملة بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة المعقمة لتتقل كمية قليلة من النمو ثم إخلطه بواسطة نفس الإبرة بنقطة النيجروسين على الشريحة ثم أنشر المخلوط على الشريحة بشكل غشاء رقيق نسبياً.

٤- أترك الغشاء ليجف تماماً فى الهواء (لاحظ عدم إستخدام الحرارة لتجفيف الغشاء أو لتثبيتته إذ أن محلول النجروسين يعمل على لصق الخلايا بالشريحة).

٥- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحصه ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية . صف وإرسم شكل ونظام تجمع خلايا الكائنات الدقيقة.

الفحص المجهرى بإستعمال الأطوار المتباينة

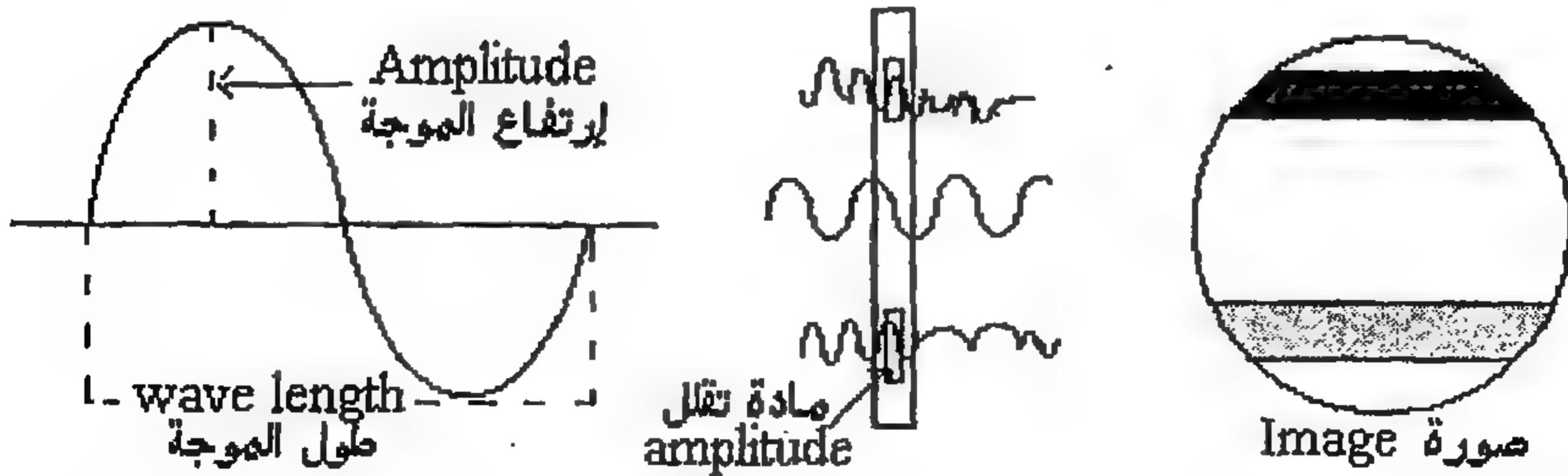
Phase Contrast Microscopy

إن معظم محتويات الخلية وتركيباتها تتميز بشفافيتها وعدم القدرة على تمييز بعضها عن بعض . ولهذا السبب فإن الدراسات السيتولوجية كانت ولا زالت تعتمد على دراسة الشرائح المصبوغة بإستعمال المجهر الضوئى . وحيث أن عمليات الصبغ تقتضى قتل الخلايا قبل وأثناء صبغها فمن الواضح أن دراسة مثل هذه التحضيرات المصبوغة ما هى إلا دراسة التركيبات غير طبيعية astifacts وليست حقيقية لذلك فقد فكر العالم الهولندى Frederic Zernike عام ١٩٣٣ فى إيجاد نوع جديد من المجاهر يساعد كثيراً فى دراسة التراكيب الداخلية للخلية الحية وهو مجهر الأطوار المتباينة والذي له المقدرة على زيادة التباين Contrast بين الجزيئات الشفافة بداخل الخلية الحية معتمداً على الاختلافات فى كثافة هذه الجزيئات .

صورة التباين Image contrast

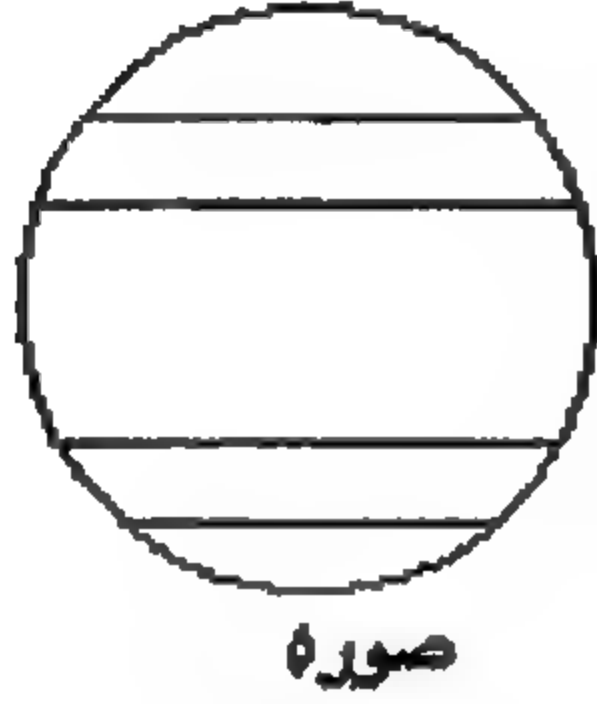
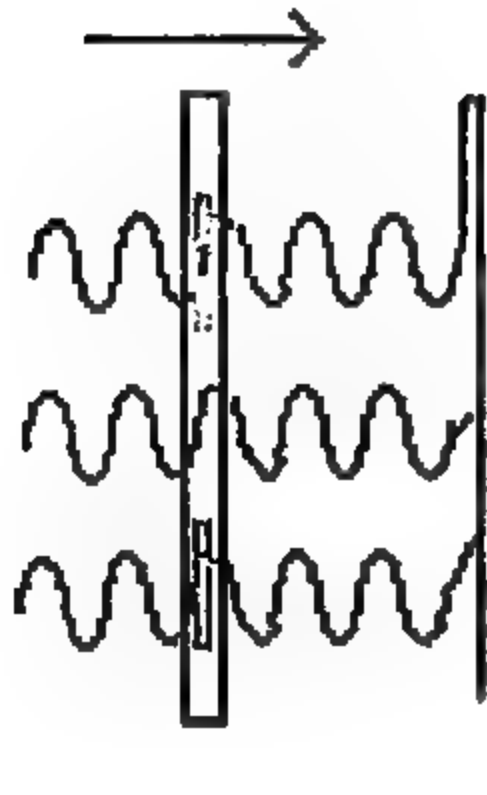
يمكن تقسيم الأشياء التى تشاهد بالمجهر إلى نوعين :-

أ- أجزاء ذات كثافة مرتفعة تعرف amplitude objects وهذه تظهر كأنها أجسام غامقة حيث أنها تقلل من كثافة الأشعة الضوئية المارة بها أو الساقطة عليها (شكل ٤) .



شكل ٤ : amplitude objects . إن درجة تقليل إرتفاع الموجه الضوئية amplitude يحدد درجة عتامه الشيء المفحوص بداخل الحقل الميكروسكوبى .

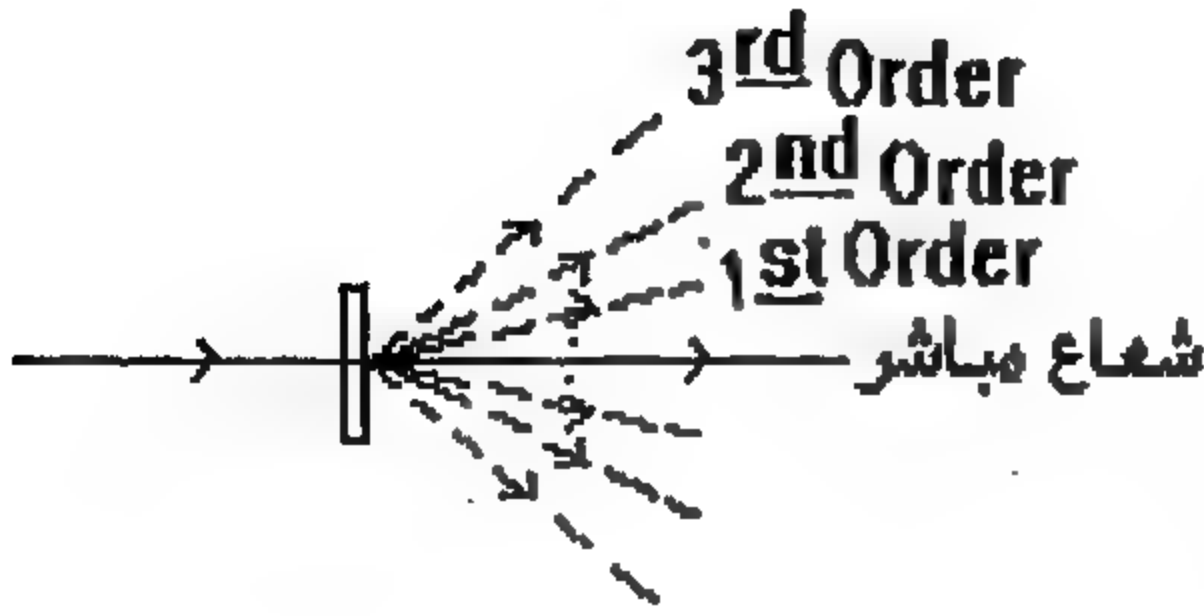
ب - أجزاء طورية Phase objects وهى شفافة تماماً حيث أن الأشعة الضوئية تمر خلالها دون أن يحدث لكثافتها أى تغيير (شكل ٥) ولما كان بعض الأشعة يمكنها أن تنفذ خلال هذه الأجسام فإن طول موجاتها سوف يتأخر بمعدل الربع وهذا التأخر يعرف بالتأخر التباينى phase shift دون التأثير على كثافة الضوء نفسه - ولما كانت الصبغات تعتبر أجزاء طورية تفتقر إلى التباين والاختلاف إذن فهى لا تستعمل بهذا النوع من الدراسة هذا علاوة على ما سبق أن بيناه بأن عمليات الصبغ تخل أو تشوه التراكيب الطبيعية داخل الخلايا نتيجة للصبغ والتسخين والتثبيت وخلافه .



شكل ٥: Phase objects يبين أن تأخر الأشعة بمعدل ربع طول موجتها دون التأثير على ارتفاع الموجة amplitude وهذا يؤدي الى ظهور أجسام شفافة .

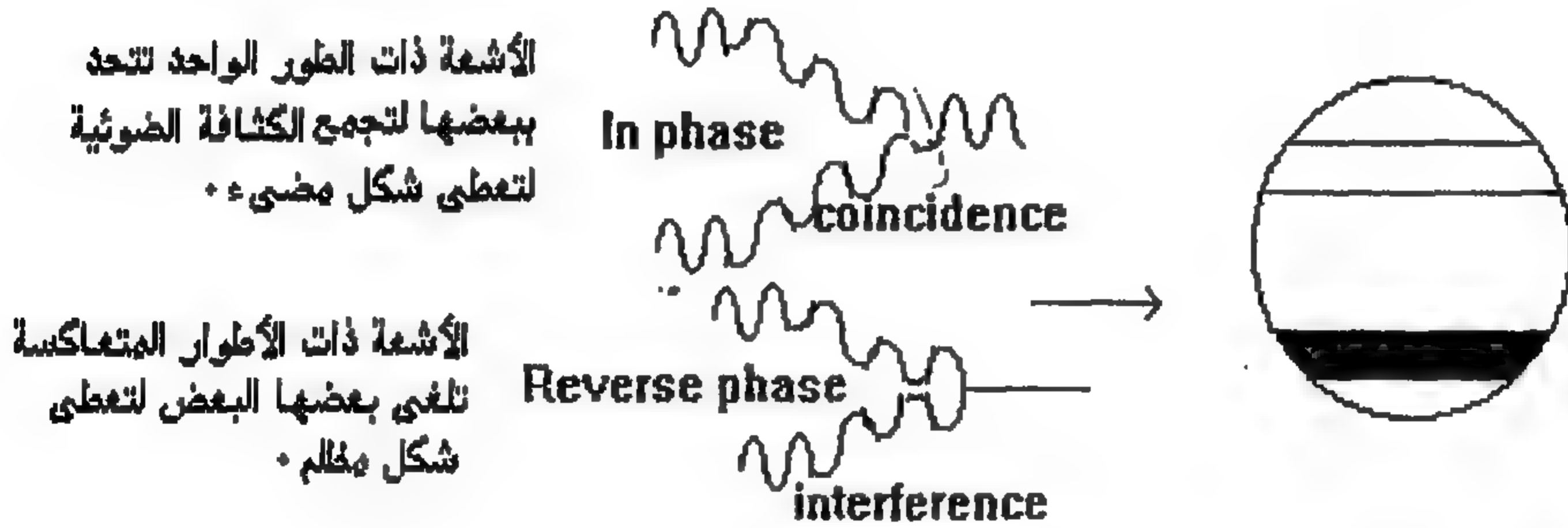
الأشعة الضوئية المباشرة والمنحرفة Direct and Diffracted light rays

إن الأشعة الضوئية المارة خلال جسم شفاف تخرج منه إما مباشرة أو منحرفة . والأشعة التى تنفذ دون أن يحدث لها أى تغيير تعرف بالمباشرة Direct وهذه الأشعة لا تتأثر كثافتها أو طورها (شكل ٦) .



شكل ٦: الأشعة الضوئية المباشرة والمنحرفة - إن كل شعاع يمر خلال فتحة ضيقة أو وسط شفاف يمر منه جزء كشعاع مباشر علاوة على أشعة أخرى لها درجات عديدة من الانحراف . ومن الواضح أن الأشعة المنحرفة ليست فى نفس طور out of phase الأشعة المباشرة .

أما الأشعة التي تنحرف أثناء مرورها البطيء نتيجة للاختلافات الموجودة بين كثافة الأشياء المارة بها تخرج منها منحرفة وهذه تعرف بالأشعة المنحرفة Diffracted وهذه الأشعة هي التي يتأخر بمعدل ربع طول موجتها والفكرة الأساسية وراء طريقة تباين الأطوار من الفحص المجهرى هو أنه إذا أمكن ضم كلا النوعين من الضوء المباشر والمنحرف المارين خلال أى جسم فى طور واحد فإن الكثافة الضوئية الناتجة تكون عبارة عن مجموع هاتين الأشعتين معا. وهذه الزيادة فى الكثافة الضوئية سوف توفر توهج brightness للجزء المفحوص. ويمكن إظهار ذلك بطريقة أخرى فإنه إذا تعاكست أشعتين لكل منهما نفس الكثافة (مع نقص $2/1$ طول موجاتها) فإن كثافتهما الضوئية تلغى بعضها البعض ويظهر الجسم فى حالة إظلام تام. وهذه الظاهرة تعرف بالتداخل interference (شكل ٧) .



شكل ٧ : يوضح التضامن Coincidence و التداخل الضوئى .

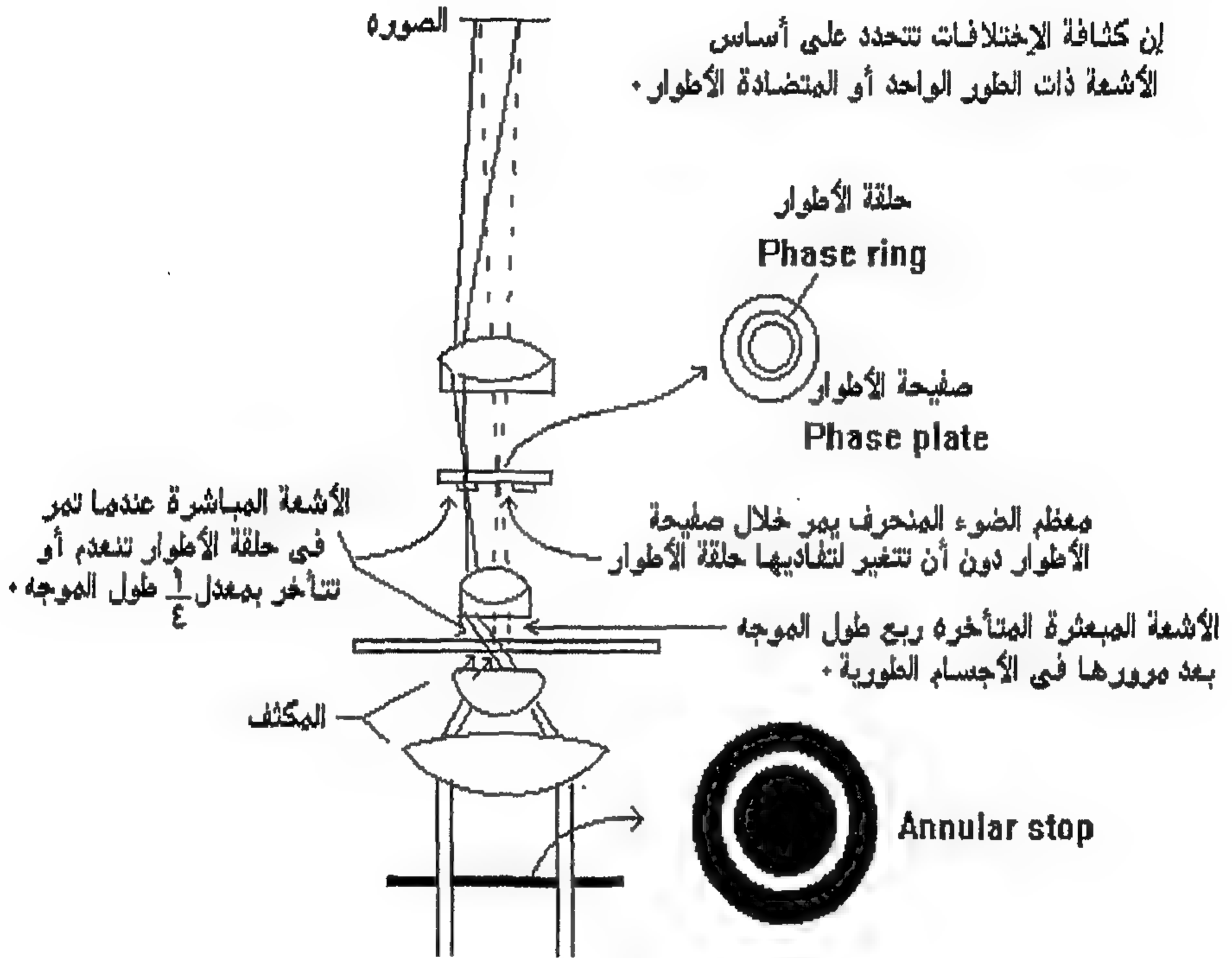
ومجهر الأطوار المتباينة الذى إكتشفه زيرنايك Zernike بدء بإستعمال إضافات مختلفة الى الحجاب المجهرى يمكن لها أن تؤخر من تقدم الضوء المباشر. راجع شكل (٥) والمجهر نوا إضافات تباين الأطوار يختلف عن المجهر ذو الحقل المضيء فى إحتواءه أولاً على نوع مختلف من الحجاب diaphragm

كما سبق أن ذكرنا وثانياً على صفيحة طورية phase plate والحجاب المميز لهذا المجهر يتكون من مانع حلقى annular stop يسمح بمرور مخروط أجوف من الأشعة الضوئية hallow cone of light rays لتستمر حتى تصل إلى المكثف condenser ثم إلى الشريحة ثم إلى الجزء المفحوص، والصفيحة الطورية هي عبارة عن قرص موضوع في نهاية بؤرة العدسة الشيئية، وعليها حلقة طورية phase ring وهذه الحلقة تقدم أو تؤخر من الضوء المباشر بمعدل ربع طول موجاته.

لاحظ في شكل (٨) أن الأشعة المباشرة تتجمع عند الحلقة الطورية ليتقدم الضوء المباشر أو يتأخر بمعدل $\frac{1}{4}$ طول موجاته، وهذه الأشعة تخرج وكأنها خطوط متصلة خلال الجزء المفحوص على الشريحة وهذه الحلقة الطورية مطلية بمادة يمكنها إحداث النقل الطوري phase shift السابق الإشارة إليه، وعلى النقيض نجد أن الأشعة المنحرفة refracted والتي حدث لها تأخير في طول موجاتها بمعدل الربع أيضاً نتيجة لمرورها في أطوار الجسم المفحوص على الشريحة لا يمكنها الوصول للحلقة الطورية ولا تتأثر بالصفيحة الطورية الموجوده بالشيئية.

ليكن من المعلوم أن تبعاً لنوعية المجهر المستعمل فإن الصورة النهائية قد تكون إما زاهية نتيجة لتضامن في الكثافات الضوئية amplitude summation وهذه تعرف bright phase microscopy أو تكون الصورة النهائية معتمة نتيجة لتداخل الكثافة الضوئية amplitude interferenec وانعكاس للأطوار phase reverse ويعرف هذا النوع dark phase microscopy وظهور الصورة النهائية بطريقة زاهية أو معتمة تكون متلازمة مع مربع الكثافة الضوئية وعلى ذلك فإن الصورة النهائية تكون أربع مرات أزهى أو أربع مرات أذكى من تلك التي يمكن مشاهدتها بالمجهر ذو الحقل المضىء.

ويجب أن نشير هنا إلى أن الأقراص الطورية المستعملة phase plates في بعض المجاهر تكون مغلفة أو مدهونة بمادة يمكنها أن تغير من أطوار الأشعة المنحرفة إلا أن النتائج النهائية تكون متشابهة مع غيرها من المجاهر التي تستعمل أقراص غير مدهونة.



شكل ٨ : النظم العدسيه لمجهر تباين الأطوار
Optical system of phase - contrast microscope.

ضبط مجهر الأطوار المتباينة

كما سبق أن ذكرنا فإن هذا النوع من المجاهر يختلف عن المجهر العادي في أن مسار الضوء يجب أن يضبط بحيث يكون المخروط الضوئي

الصادر من الحجاب الدائري مركزاً تماماً مع القرص الطوري في الشيئية وإجراء ذلك فإن المجهر يكون مجهزاً بمسامير معظمها أسفل المسرح المجهرى تحرك لتمرکز الحجاب الدائري مع القرص الطوري في الشيئية والتي تشاهد كحلقات وعادة يكون المجهر (Carl Zeiss) مجهز بثلاث شيئيات طورية phase objectives وكذلك ثلاثة حلقات بالمكثف كل منها تناظر الشيئية الخاصة بها وعادة يكون لمثل هذا المجهر حجاب خاص بالأطوار المتباينة .

التمرين الثالث

١- يرفع المكثف والحجاب العادى ويوضع مكانه حجاب ومكثف الأطوار المتباينه وله ثلاث عدسات (٣،٢،١) بها أقراص طورية وعدسة رابعة خالية من الأقراص .

٢- تستبدل الشيئيات العادية من المجهر بشيئيات طورية (ثلاث شيئيات

٣،٢،١) حيث نستعمل الشيئية رقم ١ مع فتحة المكثف رقم (١) وهكذا .

٣- عندما نشاهد حلقتين متراكبتين حرك يد الحجاب حتى تتطبق الحلقتين

على بعضهما تماماً وفي هذه الحالة يكون المجهر معد للتشغيل (شكل ٩) .

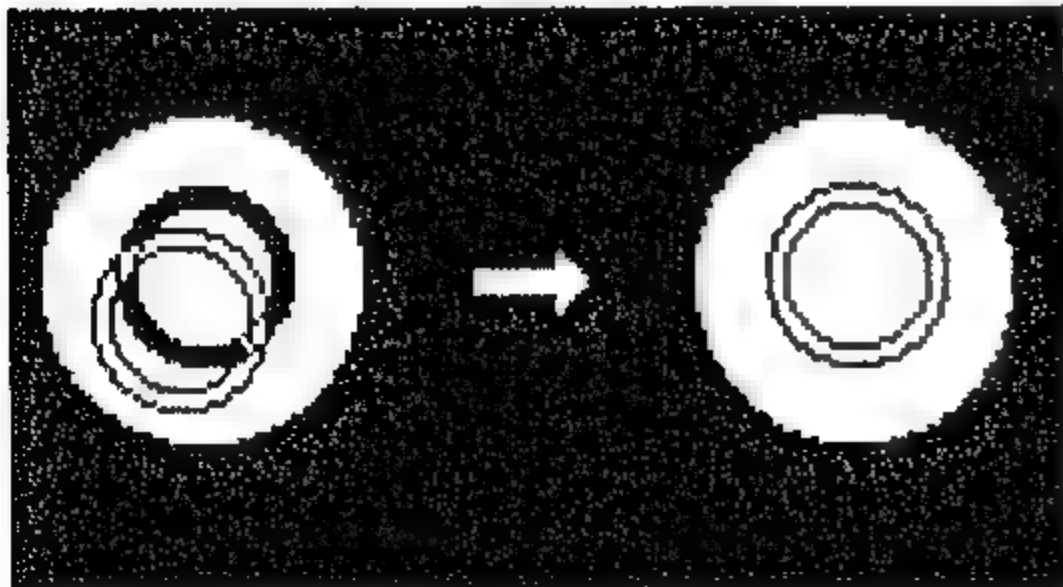
٤- حرك يد المكثف لتستحضر العدسة الخالية من الأقراص فى مسار

الضوء .

٥ - أفحص الشرائح المراد دراستها ويراعى أن يكرر ضبط الحلقات كلما

تغير استعمال شيئية بأخرى مع مراعاة أرقامها وأرقام فتحات المكثف أو

الحجاب .



شكل ٩ : الصورة اليمنى تبين

تطابق حلقة الشيئية مع حلقة المكثف

فى مجهر الأطوار المتباينه .

المجهر ذو الأشعة فوق البنفسجية

إن من المميزات الأساسية لهذا النوع من المجاهر هو الحصول على درجة أعلى من الوضوح وبالتالي درجة أعلى من التكبير عنها عند استعمال الضوء المرئي، وذلك لأن الأشعة فوق البنفسجية ذات موجات أقصر طولاً، وكما سبق أن ذكرنا أن طول موجات الضوء المرئي يعتبر عاملاً محدداً للقدرة التمييزية وأن استعمال الأشعة فوق البنفسجية يزيد من قوة التكبير والتمييز بما يقرب من مرتين أو ثلاث مرات عن تلك المتحصل عليها بالمجهر الضوئي فبواسطته يمكن تمييز جسمين يبعدان عن بعضهما بمسافة ١، ميكرون.

والمجهر ذو الإضاءة فوق البنفسجية يكون مزوداً بشيئيات مصنعة من مادة الكوارتز بدلاً من الزجاج وليس له عينية بل يكون مجهزاً بكمرات تصور العينات المفحوصة والتي تحمض وتكبر صورها فيما بعد.

ويستعمل هذا النوع من المجهر عند استعمال الأصباغ الفلورسنتية التي تمتص الأشعة فوق البنفسجية ثم تشع موجات أكبر طولاً مثل صبغة auramine O والتي تستعمل في صبغ خلايا ميكروب السل ثم تفحص بالمجهر ذو الإضاءة فوق البنفسجية فتظهر خلايا السل مضيئة في حين يبدو باقي الحقل مظلماً.

المجهر الإلكتروني

يختلف المجهر الإلكتروني (شكل ١٠) في مكوناته وطريقة تشغيله عن المجاهر الأخرى فهو يتميز بقدرة تكبيرية وإيضاحية عاليتين تزيد مائة مرة عن المجهر الضوئي ويرجع ذلك إلى القصر المتناهي لموجات الإشعاع الإلكتروني إذ يمكن به التمييز بين جسمين صغيرين يبعدان عن بعضهما بمسافة ٠,٠٠٠١ من الميكروميتر أو يمكنه أن يوضح الأجسام الصغيرة ذات الأقطار ١, نانوميتر فأكثر ولما كان من الممكن تكبير الصور المأخوذة بواسطة عدة مرات فيمكن تكبير هذه الصور عشرات المرات أيضاً دون التأثير على دقة تفاصيلها.

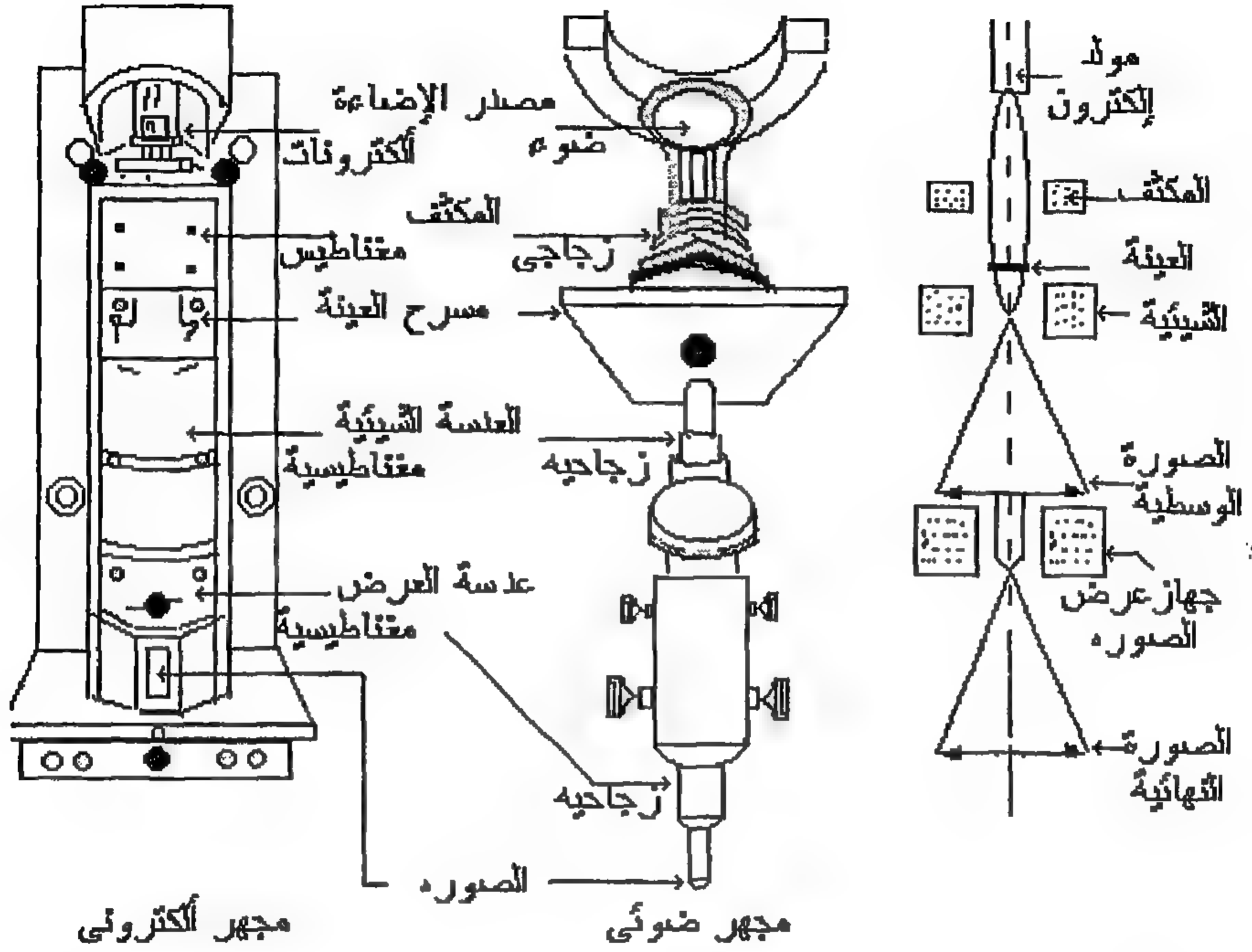
والمجهر الإلكتروني يتميز بمصدر إضاءة ومكثف وعدسات شبيثة ومكان لوضع العينه في وضع يقابل المسرح المجهرى. وكل هذه المكونات عبارة عن مجالات مغناطيسية وليست عدسات بالمفهوم المعتاد كما أنه ليس له عينية بل يتميز بوجود شاشة فلورسنتية تعرض عليها الصور الناتجة مكبرة بما يقرب من العشرين ألف مرة- كما يمكن تكبير الصور المأخوذة عشرات المرات أيضاً. وتجهز العينة بشكل غشاء خاص رقيق فوق شبكة معدنية صغيرة توضع في مكان مخصص لها بين المكثف والشبيثة السالفتي الذكر وهى بذلك تكون فى وضع يقابل مسرح المجهر الضوئي ويجهز المجهر بمصدر إلكترونى يولد أشعة إلكترونية تمر خلال أنبوبة المجهر التى تفرغ تماماً من الهواء (شكل ١٠أ).

ويشترط وضع مثل هذا النوع من المجهر فى مكان مخصص له مكيف الهواء بحيث تكون أجهزة التفرغ فى مكان مجاور بعيداً عن غرفة التشغيل. و(شكل ١٠ب) يبين الأجزاء المختلفة لهذا المجهر ومقارنتها بمثيلها فى المجهر الضوئي.

التمرين الرابع

لتحضير الخلايا المراد فحصها نجرى الآتى :

- ١- توضع عدة نقط من الكلوديون فوق كمية من الماء فى كأس سعة ٥٠٠ مل فينتشر الكلوديون على سطح الماء بشكل غشاء رقيق .
- ٢- يوضع قرص دائرى صغير (Grid) من السلك المجدول بشكل مربعات صغيرة فوق الغشاء المتكون ثم يقطع الغشاء حول القرص ثم يرفع القرص ويوضع نقطة من معلق الخلايا على القرص ثم يوضع على ورقة ترشيح جافة .
- ٣- توضع ورقة الترشيح بما عليها من أقراص فى جهاز التظليل بالمعادن .
- ٤- نوصل الدائرة الكهربائية لجهاز التظليل بواسطة قطعة سلك من الذهب أو التنجستين أو أى معدن آخر ترغب فيه ثم توصل بالتيار الكهربى ليجزء المعدن بشكل أبخرة من جزيئات المعدن وتترسب فوق الأقراص بما عليها من خلايا . وتعرف هذه العملية بالتظليل Shadowing .
- ٥- يرفع القرص ويوضع بالمكان المخصص له فى المجهر الألكترونى المجهز للأستعمال . ثم يفحص محتويات كل مربع من مربعات القرص وذلك بتحريك ضابط لتظهر المربعات بما تحتويها على شاشة العرض فى المجهر الألكترونى .



شكل ١٠ أ : لأجزاء
الأساسية مجهر الكتروني
(الكترومغناطيسي) لاحظ
مسار الإلكترونات وتكوين
الصورة.

شكل ١٠ ب: الأجزاء الأساسية للمجهر الإلكتروني
وما يماثلها في المجهر الضوئي.

والجدول التالي (جدول ١) يبين مقارنة للطرق المجهرية المختلفة
المستخدمة في دراسة وفحص البكتيريات .

جدول ١: مقارنة بين الطرق المجهرية المختلفة مع بيان مزايا وعيوب كل منها:

الطريقة	المميزات	العيوب
استعمال المجهر الضوئي مع الحقل المضيء •	يستعمل في فحص الخلايا الحية أو الميتة المثبتة والمصبوغة •	لا يمكن تمييز الأشياء التي يقل قطرها عن ١٥-٢ ميكرون •
استعمال المجهر الضوئي مع الحقل المظلم	يستعمل في فحص الخلايا الحية حيث يمكن بواسطة هذه الطريقة رؤية التركيبات التي لا يمكن مشاهدتها بطريقة أخرى •	لا تزيد القوة التمييزية لهذه الطريقة عن الطريقة السابقة فيما عدا أنه يمكن رؤية الجزيئات الغروية أكبر حجماً •
المجهر ذو الإضاءة فوق البنفسجية	تزداد قدرة التمييز حيث يمكن بواسطة رؤيته الأجسام الصغيرة الحجم	تمتص الأشعة فوق البنفسجية بواسطة القواعد النووية مثل البيورينات والبريميدينات Purines&Pyrimidines حيث يمكن رؤية أجسام حلقية بكثرة داخل الخلايا •
مجهر الأطوار المتباينة Phase-contrast	يستعمل في فحص الخلايا الحية أو المثبتة وغير المصبوغة حيث يمكن بواسطة تمييز التركيبات التي لا يمكن رؤيتها بغيره من الطرق •	لا يمكن بواسطته معرفة طبيعة تركيب المرئيات الجديدة التي يميزها •
المجهر الإلكتروني	قدرته التمييزية مرتفعة جداً تصل إلى مائة مرة قدر تلك المشاهدة بالمجهر الضوئي •	يجب أن تكون التحضيرات جافة كما أن الاختلافات في بعثرة الإلكترونات لا يمكن تحليلها •

فحص ودراسة حركة البكتيريات Motility of Bacteria

بعض البكتيريات تكون متحركة Motile حركة حيوية Vital movement في حين أن البعض الآخر لا تتحرك. وهذه الحركة الحيوية تعزى إلى وجود أعضاء للحركة تسمى الأسواط Flagella.

ويمكن دراسة حركة البكتيريات بالفحص الميكروسكوبى لخلايا البكتيريات الحية غير المصبوغة بواسطة تحضير النقطة العالقة Hanging drop preparation ويجب التمييز بين الحركة الحقيقية الحيوية التقدمية للبكتيريات وبين الحركة البراونية Brownian movement فالأخيرة حركة تنبذية للأمام والخلف تحدث لأى جسم صغير سواء كان حياً أو ميتاً يكون عالقاً فى سائل ما، وذلك نتيجة لإصطدام جزيئات السائل بهذا الجسم دون تغيير فى وضع الجسم بالنسبة للأجسام الأخرى العالقة فى السائل.

عند محاولة التعرف على نوع جديد مجهول من البكتيريات فمن الضروري التعرف على أنه متحرك أو عديم الحركة وهناك عدة طرق يمكن إتباعها للتعرف على ذلك ولكل طريقة مميزاتا وعيوبها وعلى الدارس أن يختار الطريقة التى تناسب وترضى دراسته وفيما يلى وصف لكل من هذه الطرق.

أ. التخميل الرطب Wet movement

التمرين الخامس (أ)

١- ضع نقطة من معلق البكتيره أو من المزرعة السائلة على سطح شريحة نظيفة.

٢- غطى النقطة بغطاء شريحة رقيق.

٣- يفحص التحضير بإستعمال مجهر الأطوار المتباينة مع إستعمال العدسة الشيئية الكبرى والجافة ويحكم على الخلايا بالحركة إذا شوهد عدد قليل منها تتحرك حتى ولو كان غالبية الخلايا المختبره غير متحركة .
وعند إستعمال المجهر ذو الحقل المضيء فمن الضروري أن تصل الإضاءة إلى الحد الأدنى وبإستعمال العدسة الكبرى الجافة يمكن بعدها وضع نقطة من زيت السيدر على غطاء الشريحة وتحرك القطعة الأنفية لتستحضر العدسة الزيتية . وتعتبر هذه الطريقة أسرع الطرق للتعرف على الحركة ونفس التحضير يمكن أيضاً أن يدرس خلاله شكل الخلايا وتجمعاتها المنتظمة في مكعبات أو أزواج أو سلاسل أو تكون في تجمعات غير منتظمة حيث أن إستعمال الحرارة لتثبيت الغشاء البكتيري يؤثر على مظهر الخلية وعلى طريقة تجمعها .

ومن عيوب هذه الطريقة أن التحضير يجف بسرعة مما يمتنع معه الحركة أو يكون الكائن ممرض للإنسان وهناك إحتمال لعدوى الفاحص .

ب - طريقة النقطة العالقة Hanging Drop Method

إذا أريد فحص حركة الكائن البكتيري لفترة طويلة يستحسن إتباع هذه الطريقة . وفيها تفحص الخلايا وهي سابحة في نقطة من المزرعة وهذه النقطة تكون عالقة على سطح غطاء شريحة ومدلاة في تجويف في شريحة ذات تجويف يقابل الغطاء فبذلك تكون النقطة العالقة وكأنها في حجرة زجاجية مغلقة لايسمح لها بالجفاف إلا بعد مرور وقت طويل .

وأحياناً يكون من الصعب دراسة الحركة بهذه الطريقة حيث أن التجويف الموجود بالشريحة يكون أسمك من الشريحة العادية فهذا يحتاج إلى إتباع طريقة خاصة لبؤرة الأجسام المرئية . كما يجب مراعاة الحرص الشديد

حتى لا ينكسر غطاء الشريحة لشدة قربه من العدسة الشيئية وتسهل عملية الفحص إذا ما بدأ بدراسة ما بداخل حافة (محيط) النقطة العالقة وما تحتويه من خلايا وتفحص النقطة العالقة عادة بإستعمال المجهر ذو الحقل المضيء سواء بالقوة الكبرى الجافة أو الزيتية ويمكن بهذه الطريقة أيضاً دراسة شكل وتجمعات الخلايا علوة على تحركها.

التمرين الخامس (ب)

١- إنقل بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة نقطة صغيرة من المزرعة البكتيرية حديثة العمر (١٨-٢٤ ساعة) نشطة النمو سواء نامية في بيئة سائلة أم صلبة وفي الحالة الأخيرة يراعى تعليق النمو في نقطة من الماء المعقم أو ماء معقم به قليل من الببتون وضعها في مركز غطاء الشريحة النظيف . (يراعى النظافة التامة للشرائح المستعملة وأغطيتها).

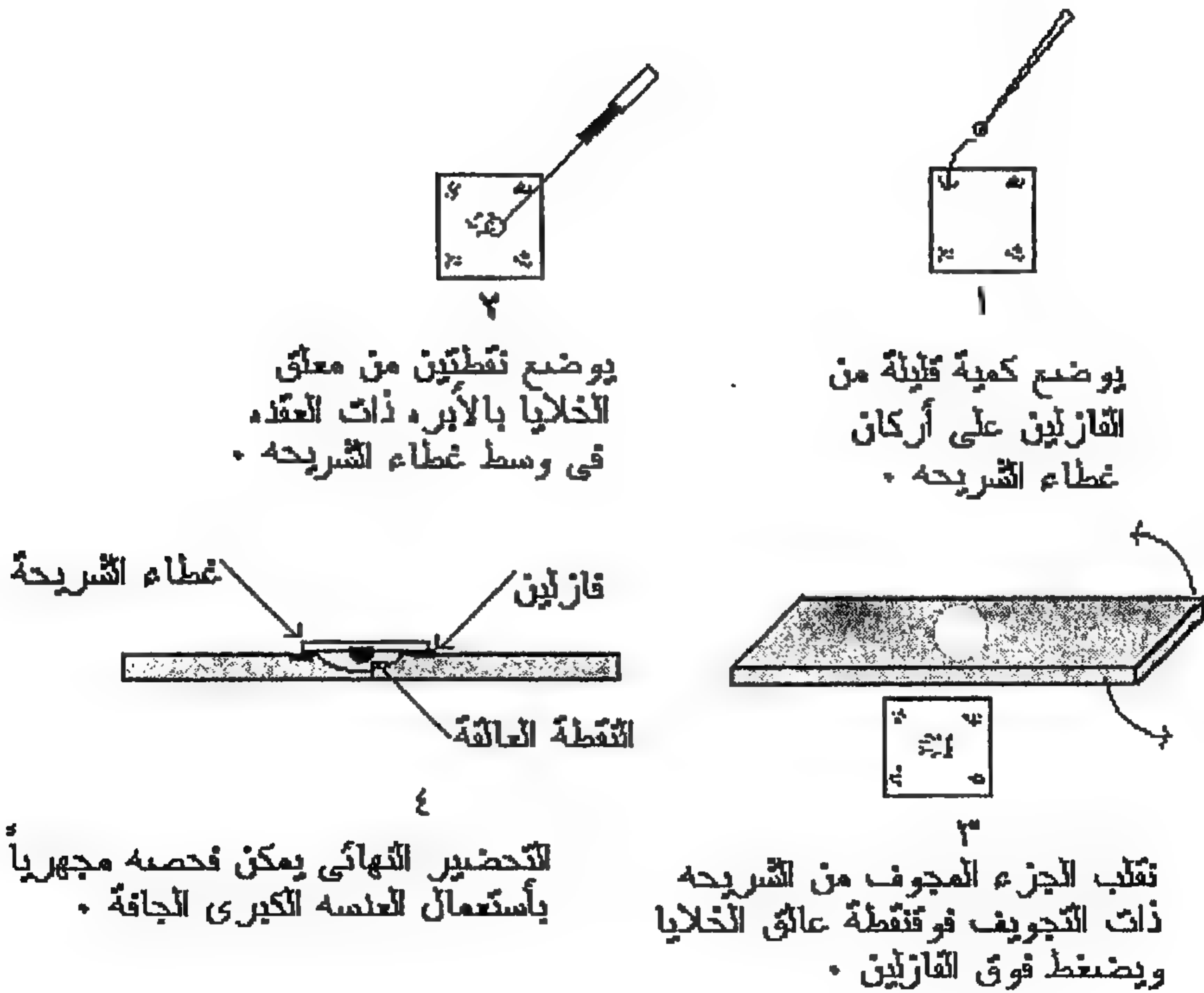
٢- إنقل بواسطة الإبرة ذات العقدة أربع نقط صغيرة جداً من الفازلين وضعها حول حواف تقعر الشريحة المقعرة النظيفة ويمكن أيضاً وضع نقطتين صغيرتين من الماء عند ركنين من أركان غطاء الشريحة المربع الشكل (شكل ١١-أ) لابد من وضع ٤ نقط حول حواف التقعر (يمكن استعمال أجزاء صغيرة من الفازلين بدلاً من الماء) والغرض من ذلك هو تثبيت الغطاء بالشريحة المقعرة وعدم تبخر النقطة العالقة أثناء الفحص .

٣- إقلب بإحتراس غطاء الشريحة ثم ضعه فوق الجزء المقعر للشريحة المقعرة Concave slide بحيث تكون النقطة المعلقة في منتصف التقعر بدون أن تلامس قاعه (شكل ١١-أ) .

٤- ضع التحضير على مسرح الميكروسكوب مستعملاً الشيئية الصغرى (١٦مم) . حرك الضابط التقريبي حتى تظهر حافة النقطة العالقة ويراعى تحريك الشريحة حتى تظهر حافة النقطة فى منتصف الحقل الميكروسكوبى، ونظراً لأن النقطة شفافة فإن حافتها لن تظهر إذا كانت الإضاءة شديدة لذلك يجب تقليل الإضاءة بقل الحجاب جزئياً وتخفيض المكثف قليلاً (لاتفحص حافة تعبير الشريحة بدلاً من حافة النقطة) .

٥- أدر القطعة الأنفية لإستبدال الشيئية الصغرى ١٦مم بالشيئية الكبرى

٠٤مم٠



شكل ١١ - أ : تحضير النقطة المعلقة .

٦- إفحص حافة النقطة المعلقة مع استعمال المعدل الدقيق . عدل الإضاءة بخفض أو رفع المكثف واستعمال الحجاب حتى ترى الأحياء الدقيقة عند الحافة بوضوح .

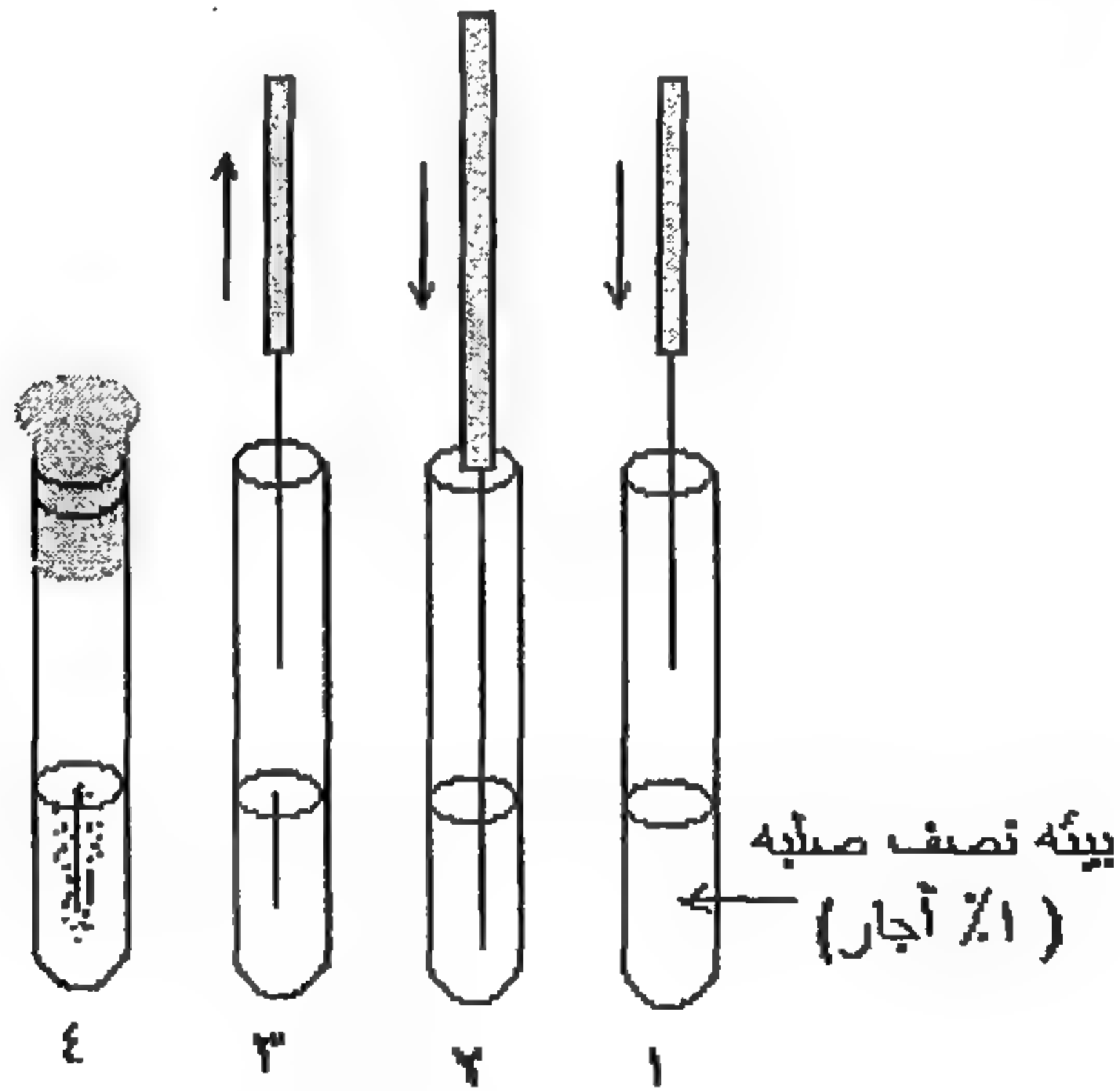
٧- صف مع الرسم حركة وشكل وطريقة تجمع خلايا الكائنات الآتية:
Corynebacterium facians, *Bacillus subtilis*,
Sarcina lutea , *Escherichia coli* , *Saccharomyces cerevisiae* (خميرة)

ج - طريقة الآجار نصف صلب

التمرين الخامس (ج)

لقح آجار عميق نصف صلب عن طريق الوخز كما هو موضح بالشكل
 ١١ - ب ضع الأنابيب بالحضانة 37° م لمدة ٤٨ ساعة .

يمكن الحكم على حركة البكتيريات من طبيعة النمو على طول خط
 الوخز كما هو بشكل ١١ - ب .



شكل ١١ - ب خطوات الوخز العميق لاختبار الحركة تكبير البيئة حول خط
 التلقيح تعنى الحركة كما في (٤) - يمكن الحكم على الحركة من طبيعة النمو .

تحضير الغشاء البكتيرى تهيئة للصبغ

التمرين السادس (أ)

- ١- إغسل الشريحة الزجاجية جيداً بالماء والصابون ثم جففها جيداً
وتعامل معها من حوافها وليس من سطحها .
- ٢- أكتب على أحد جوانب الشريحة الحرف الأول من اسم الجنس
والحرف الأول من اسم النوع البكتيرى المزمع فحصه بقلم Marker .
- ٣- ولتحديد مكان الفحص ارسم بنفس القلم دائرة فى منتصف السطح
السفلى للشريحة وعندما يزداد مرانك سوف لاحتاج إلى هذه الخطوة .
- ٤- رج المزرعة السائلة جيداً ثم انقل ملء حلقة الإبرة ذات الحلقة
بالمزرعة وذلك بعد تعقيمها وضعها على السطح المقابل للدائرة السابق رسمها
على السطح المقابل ، لاتنسى أن تعقم الإبرة بعد هذه العملية أيضاً .
- ٥- فى حالة المزارع النامية على آجار مائل ، ضع على الشريحة نقطة
من الماء ، ثم التقط بواسطة الإبرة المعقمة كمية ضئيلة من النمو البكتيرى ثم
إخلطها بنقطة الماء جيداً ، لاتنسى تعقيم الإبرة بعد الإستعمال .
- ٦- ثم بواسطة الإبرة إفرد نقطة المزرعة فى مساحة ٢/١ بوصة على
سطح كل من سطحي شريحتين نظيفتين ، ثم عقم الإبرة مرة أخرى .
- ٧- أترك الشريحتين ليجفا فى الهواء وبعد جفافهما تماماً مررهما فوق
الهواء الساخن المنبعث من لهب مصباح بنزن لقتل الخلايا وتثبيتها على سطح
الشريحتين .
- ٨- ضع نقطة من الفوكسين على إحدى الشريحتين وأتركها لمدة دقيقة –
ثم أغسلها وجففها .
- ٩- ضع نقطة من زيت السيدر على كل من الشريحتين ثم أفحص الخلايا
بكل منهما بالعدسة الزيتية .

- ١٠- لاحظ أن الخلايا غير المصبوغة لا تظهر بوضوح لشفافيتها فى حين أن المصبوغة ترى واضحة .

الأصبغ المستعملة لصبغ البكتيريات

نظراً لشفافية الخلايا البكتيرية فهى تصبغ حتى يسهل رؤيتها فى التحضيرات الميكروسكوبية . وعلاوة على ذلك فإن صبغ البكتيريات يعتبر ضرورياً لسهولة التعرف على بعض التركيبات الخلوية الخارجية، مثل الأسواط والغلاف أو الداخلية مثل الحبيبات والجراثيم الداخلية، والأجسام النووية وغيرها من التركيبات الدقيقة .

ويمكن تقسيم الصبغات المستعملة إلى ما يلى:

أولاً صبغات طبيعية: Natural dyes

وهى التى تنتج طبيعياً ويمكن إستخلاصها من أنسجة النباتات وبخاصة فى الدراسات السيئولوجية ومن أمثلتها صبغة الهيماتوكسلين Hematoxylin والتى تستخرج من نبات *Hematoxylin campechianum* وهذه الصبغة فى حد ذاتها لا تصبغ الأنسجة إلا فى وجود أيونات من الحديد (وفى صورة حديدك Ferric) أو أيونات الألومنيوم Aluminum .

ثانياً صبغات صناعية أو تركيبية: Artificial or Synthetic dyes

وهى التى تستعمل حالياً بكثرة وتستخلص من قطران الفحم، ولذلك تسمى أصباغ قطران الفحم Coal-tar dyes وأصبغ قطران الفحم هى عبارة عن مشتقات من المركب الحلقى البنزين C_6H_6 أو الكينون $C_6H_4O_2$ وقد تسمى أيضاً

أصبغ الأنيلين Aniline dyes ، وبالرغم من وجود كثير من الصبغات الحالية ليست أنيلينية، إلا أنها تسمى كذلك مجازاً حيث أن أول صبغة استعملت من هذه الصبغات كانت مشتقة من الأنيلين .

ونظراً لأن التركيب الكيماوى للأصبغ عموماً معقد ولا يمكن تداوله فى المجال التجارى، لذا يفضل المنتجون لها إعطاء أسماء خاصة للأصبغ التى ينتجونها، ولذلك فإن صبغة معينة قد تباع بالأسواق تحت أسماء مختلفة، فمثلاً الماجنتا Magenta و الفوكسين، إسمين مختلفين لصبغة واحدة حمراء وردية تركيبها الكيماوى بارا-روز أنيلين، ومنعاً للإرتباك وضعت مواصفات خاصة لكل صبغة، ونشرت جمعية الصباغين بانجلترا دليل الألوان Colour Index، وضع فيه رقم خاص لكل صبغة، وفى ألمانيا وضع شولز Schultz نشرة مماثلة للدليل السابق فمثلاً الصبغة CI No.841 أو Schultz No.679 تدل على أن الصبغة هى السفرانين .

نظريات الصبغ Theory of staining

هناك عدة نظريات يفسر على أساسها حدوث الإصطبغ عند استعمال الصبغات المختلفة منها ما يستند على أسس فيزيائية ومنها ما يستند على أسس كيماوية .

(١) النظرية الفيزيائية physical theory

تعرف العملية الفيزيائية بأنها تفاعل بين مادتين دون أن يتكون مركب جديد نتيجة للتفاعل وتفسر عملية الإصطبغ بأنها نتيجة الخاصية الشعرية أو القوى الأسموزية أو إلى الإدمصاص أو الإمتصاص .

(ب) النظرية الكيماوية Chemical theory

يتكون نتيجة للتفاعل الكيماوى بين الصبغة والمادة المصبوغة مركب جديد له صفات طبيعية وكيماوية مختلفة عن المواد المتفاعلة الأصلية، وبالتالي لايمكن استرجاع المواد المتفاعلة الأصلية بواسطة المذيبات البسيطة.

وعندما تصبغ البكتيريات بالصبغات السالفة الذكر، لا يوجد دليل قوى يبين أن الصبغة تتغير كيماوياً ليتكون مركب جديد لايمكن استخلاصه. وفى الحقيقة يمكن استخلاص كل الصبغة تقريباً من الخلية البكتيرية المصبوغة عقب غمرها لمدة طويلة فى الماء أو فى الكحول أو فى المذيبات الأخرى، ومن الناحية الأخرى توجد مكونات فى الخلية تعتبر حمضية فى تفاعلها وأخرى ذات تأثيراً قلويّاً، وعلى ضوء هذه الحقيقة يمكن تفسير ظاهرة الصبغ على أساس كيماوى بحت، فالصبغات الحمضية تتفاعل مع المكونات القاعدية من الخلية (السييتوبلازم) والصبغات القاعدية تتفاعل مع المكونات الحمضية من الخلية (كروماتين النواه). مما تقدم يتضح لنا التضارب فى تفسير إصطباج البكتيريات، والواقع أن عمليات الإصطباج لا تتم بالبساطة السابق وصفها، وربما كانت هذه النظريات لا تفسر كل الحقائق. وقد يكون صبغ الخلايا عبارة عن عملية فيزيائية وكيماوية فى نفس الوقت.

معمق اللون Mordant

فى بعض محاليل الصبغات يمكن إضافة مواد لها قابلية بأن تجعل بعض التركيبات تأخذ كمية من الصبغة أكثر عنه فى حالة غياب هذه المادة، وتسمى هذه المواد بمعمقات الألوان Mordants مثل حمض التانيك Tannic acid واليود وأيونات الحديد.

الصبغ البسيط Simple Staining

يقصد بالصبغ البسيط استعمال صبغة مفردة فى صبغ خلايا البكتيريات ويتم الصبغ بعد أن يحضر غشاء من معلق الخلايا البكتيرية فى الماء على شريحة نظيفة ويثبت الغشاء بعد ذلك حرارياً وذلك بترك الشريحة أولاً ليحفظ عليها الغشاء بجو المعمل، ثم تمرر الشريحة عدة مرات فى لهب بنزن لتثبيته . وتعتبر طريقة التثبيت الحرارى هذه طريقة مثلى، فالخلايا البكتيرية ذات جدر صلبة لا تتأثر ولا تتشوه عندما تجف وتثبت على هذا النحو .

ويجب الإهتمام بنظافة الشريحة إذ أن وجود آثار من المواد الدهنية عليها يعيق توزيع معلق الخلايا توزيعاً منتظماً على سطحها كما أن ذلك يؤثر على درجة ثبات الغشاء على سطح الشريحة فيكون عرضه للغسيل أثناء عملية الصبغ .

ولتحضير الغشاء البكتيرى يفضل استعمال مزرعة نامية على بيئة صلبة حيث أن الغشاء المحضر من مزرعة سائلة مباشرة تشتمل على مكونات البيئة وهى أيضاً قابلة للإصطباغ، وعلاوة على ذلك فإن وجود مكونات البيئة قد يؤدى إلى تقليل درجة إلتصاق الخلايا بالشريحة أثناء التثبيت .

التمرين السادس (ب)

١- مرر شريحة نظيفة فى لهب بنزن للتخلص مما قد يكون عالقا بها من آثار دهنية • انتظر حتى تبرد الشريحة، ثم ضع بواسطة الإبرة ذات العقدة نقطة من الماء فى مركز الشريحة (إذا كانت الشريحة نظيفة فإنه يمكن فرد نقطة من الماء على سطحها بانتظام بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة، أما الشريحة غير النظيفة فإن نقطة الماء تتجمع عليها بشكل قطرات متفرقة، وبذلك لايتكون غشاء منتظم) •

٢- إمس النمو البكتيرى من مزرعة نامية على آجار مائل بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة بعد تعقيمها • (يراعى عدم نقل كمية كبيرة من النمو البكتيرى أو أخذ جزء من الآجار إلى الشريحة إذ أن ذلك يعيق رؤية الخلايا البكتيرية بوضوح علاوة على العيوب الأخرى الناتجة عن مكونات البيئة) •

٣- إنقل ما يعلق بإبرة التلقيح إلى نقطة الماء بمركز الشريحة وإخلطه بها حتى تتكون عكارة خفيفة ، أنشر المعطوق البكتيرى الناتج بنفس إبرة التلقيح حتى يتكون غشاء رقيق منتظم •

٤- أترك الغشاء ليحفظ تماماً فى الهواء •

٥- ثبت الغشاء الجاف بتمرير الشريحة عدة مرات فى لهب بنزن (يراعى أن يكون سطح الشريحة الذى عليه الغشاء متجهاً باستمرار إلى أعلى) •

٦- انتظرحتى تبردالشريحة ثم أغمر سطح الشريحة بكمية كافية من محلول صبغة كربول الفوكسين Carbol fuchsin لمدة دقيقة •

٧- تخلص من محلول الصبغة ثم أغسل الشريحة بواسطة الماء

الجارى •

٨- أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء •

٩- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحصه ميكروسكوبياً بواسطة العدسة الزيتية ويتم ذلك بعد ضبط الضوء بالإستعانة بالمرآة والمكثف والحجاب مستعملاً القوة الصغرى (٦ مم) ، ثم تحرك القطعة الأنفية لوضع العدسة الزيتية في وضع الإستعمال، ثم حرك الضابط التقريبي ليتمكن إنزال أنبوبة الميكروسكوب بحذر حتى تتغمس العدسة الزيتية (٢ مم) في نقطة الزيت وتتم هذه الخطوة والعينان تنظران إلى الشريحة والعدسة الزيتية ثم ينظر بعد ذلك خلال العدسة العينية ويحرك الضابط الدقيق حتى ترى الخلايا البكتيرية بوضوح .

١٠- صف مع الرسم شكل ونظام تجمع خلايا الكائنات البكتيرية

والخميرة الآتي بيانها عند فحص تحضيراتها مصبوغة بكاربول الفوكسين:

Corynebacterium fascians , *Bacillus subtilis* , *Sarcina lutea*, *Escherichia coli* , *Pseudomonas marginata* , *Streptomyces sp.* , *Staphylococcus aureus* , *Saccharomyces cerevisiae*.

١١- كرر الخطوات العشر السابقة بإستعمال صبغة أزرق الميثيلين بدلاً

من صبغة كاربول الفوكسين .

الصبغ المركب Compound staining

تستعمل في هذه الطرق أكثر من صبغة واحدة، ويعرف هذا النوع من الصبغ أيضاً بالصبغ التفريقي Differential staining ، وخاصة عندما تجرى التفريق بين البكتيريا في مجاميع مختلفة تبعاً لتفاعلها مع الصبغة . وتعتبر صبغة جرام والصبغ المقاوم للأحماض من أهم طرق الصبغ المركب أو التفريقي المتبعة في الدراسات البكتريولوجية .

أ - صبغة جرام Gram stain

أهم طرق الصبغ المركب أو الصبغ التفريقي وأول من إستعملها (كريستيان جرام ١٨٨٤ ، Christian Gram) ، لذلك فهي تعرف بإسمه وعند إتباع هذه الطريقة نجد أن بعض البكتيريا تصبغ بالصبغة القاعدية (الكريستال البنفسجي Chrystal violet) في وجود اليود، بدرجة لا يمكن معها إزالة الصبغة من الخلايا عن طريق الغسيل بالكحول أو الأسيتون، في حين أن البعض الآخر من خلايا البكتيريا يمكن إزالة الصبغة منها بسهولة بإستعمال الكحول . والمجموعة الأولى من البكتيريا تعرف بالبكتيريا الموجبة لتفاعل جرام Gram positive ، أما المجموعة الثانية فهي تعرف بالبكتيريا السالبة لتفاعل جرام Gram negative .

ولتسهيل رؤية خلايا المجموعة الثانية تستعمل صبغة أخرى ذات لون أحمر مثل السفرانين Safranin ، والتي تضاف بعد الغسيل بالكحول وتسمى بالصبغة العكسية Counter stain ، حيث تصطبغ الخلايا السالبة بعدها باللون الأحمر .

ويبدو أن التفسير الحقيقي لهذا الاختلاف يرجع إلى أسس كيميائية ، إذ أن سطوح الخلايا الموجبة لصبغة جرام أو الجزء القريب من سطوحها، يحتوى

على كميات من ملح الماغنيسيوم لحمض الريبونوكليك Ribonucleic acid والتي تكون مركب معقد مع كل من البروتين الخلوى وصبغة الكريستال البنفسجية واليود . وهذا المركب المعقد يثبت الصبغة فى الخلية ويجعلها أكثر مقاومة للإزالة عند الغسيل بالكحول .

أما البكتيريات السالبة لصبغة جرام فإن التركيب الكيماوى لسطح خلاياها لا يحتوى على حمض الريبونوكليك والماغنيسيوم، لذلك فإن صبغة الكريستال البنفسجى لا تثبت فى الخلايا بالطريقة السابق وصفها فهى تزال عند الغسيل بالكحول .

وبالرغم من أن البكتيريات السالبة لصبغة جرام تظل بإستمرار سالبة لهذه الصبغة، إلا أن البكتيريات الموجبة يمكنها تحت ظروف خاصة أن تظهر تفاعلات متباينة مع هذه الصبغة أو تفقد إيجابيتها لها، فمثلاً المزارع الموجبة لجرام قد تفقد خلاياها القدرة على الإحتفاظ بصبغة الكريستال البنفسجى عندما تتقدم فى السن وتصبح سالبة لها، وكذلك قد تتأثر الخلايا الموجبة لجرام عند إرتفاع حموضة البيئة، كما تفقد الخلايا الموجبة لجرام إيجابيتها إذا عوملت خلاياها بإنزيم Ribonuclease الذى يذيب Ribonucleic acid أو أملاحه من السطح الخلوى، أو إذا سحقت الخلايا الموجبة لجرام مع برادة الزجاج أو الألومنيوم لتكسير جدرانها الخلوية فإن بقايا الخلايا المهشمة تفقد إيجابيتها لهذه الصبغة .

وقد أجريت تعديلات طفيفة على الطريقة التى إتبعها جرام، وفيما يلى خطوات الصبغ كما حورها هوكر Hucker وهى الخطوات الأكثر إتباعاً .

التمرين السابع

- ١- حضر غشاء من المزرعة البكتيرية النامية على آجار مائل لمدة ٢٤-٤٨ ساعة، ويثبت بتمريره في اللهب عدة مرات بالطريقة الموضحة سابقاً.
- ٢- إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم اغمر الغشاء بمحلول صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet لمدة دقيقة.
- ٣- تخلص من محلول الصبغة ثم اغسل الشريحة بالماء الجارى.
- ٤- أغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة دقيقة.
- ٥- تخلص من محلول اليود ثم اغسل الشريحة بالماء الجارى ثم أتركها لتجف في الهواء.
- ٦- اغسل الغشاء بمحلول كحول الإيثايل (٩٥٪) وذلك بإضافته للشريحة نقطة فنقطة مع إمالة الشريحة ليتساقط منها الكحول بعد مروره على الغشاء وتستمر الإضافة حتى يصبح الكحول المتساقط عديم اللون.
- ٧- اغسل الغشاء بعد ذلك بالماء الجارى.
- ٨- أغمر الغشاء بمحلول صبغة السفرانين لمدة نصف دقيقة.
- ٩- تخلص من محلول الصبغة ثم اغسل بالماء الجارى.
- ١٠- أترك الشريحة حتى تجف تماماً في الهواء . يمكن الإسراع في التجفيف بتعريض الشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب مصباح بنزن .
- ١١- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحص ميكروسكوبياً بإستعمال العدسة الزيتية . إذا كانت الخلايا بنفسجية تكون البكتيرات موجبة لجرام وإذا كانت حمراء تكون البكتيرات سالبة لجرام .
- ١٢- حضر أغشية مثبتة من البكتيرات *E. coli* , *Corynebacterium fascians*, *Bac.subtilis* ثم أصبغها بطريقة جرام . بين تفاعل البكتيرات مع الصبغة . مبيناً شكل ونظام تجمع الخلايا .

ب - الصبغة المقاومة للأحماض Acid Fast Stain

بعض الأنواع التابعة للجنس *Mycobacterium* مثل البكتيريا التي تسبب السل *Mycobacterium tuberculosis* تمتلك خواص طبيعية أو كيميائية تجعل من الصعب صبغ خلاياها بالطرق العادية • ولكن إذا عرضت الشريحة للحرارة أثناء الصبغ لمدة طويلة نسبياً، فإن الحرارة تعمل على دخول الصبغة إلى الخلية ويكون من الصعب إزالة الصبغة منها حتى ولو غسلت بالكحول المحمض بحمض HCl مثل هذه البكتيريا تعرف بأنها مقاومة للأحماض Acid fast •

أما إذا أمكن إزالة الصبغة من الخلايا بواسطة الكحول المحمض فتعرف بأنها غير مقاومة للأحماض Non-acid fast •

وعلى ذلك فالبكتيريا المقاومة للأحماض تحتفظ بصبغة كربول الفوكسين- التي تستعمل عادة في هذه الطريقة- وتظهر الخلايا بلون أحمر أما البكتيريا غير المقاومة للأحماض فتزال منها الصبغة عند الغسيل بالكحول المحمض، ولتسهيل رؤية الخلايا غير المقاومة للأحماض تضاف صبغة عكسية Counter stain ذات لون مخالف مثل أزرق الميثيلين، وبذلك تظهر بلون أزرق •

ويرجع السبب الأساسي للاختلاف بين هاتين المجموعتين من البكتيريا إلى وجود تركيزات مرتفعة من الدهون في الأغشية السيتوبلازمية لخلايا البكتيريا المقاومة للأحماض • وهذه الدهون تمنع أو تؤخر دخول الصبغة إليها أو خروجها منها • ويعتقد بعض الباحثين أن وجود حمض الميكوليك Mycolic acid في البكتيريا المقاومة للأحماض بنسبة كبيرة قد يكون السبب المحتمل لإيجابيتها • وفيما يلي طريقة Ziehl&Neelsen لصبغ البكتيريا بالصبغ المقاوم للأحماض :

التمرين الثامن

- ١- حضر غشاء من مزرعة البكتيره *Mycobacterium phlei* وآخر من مزرعة البكتيره *E. coli* ثم يثبت بتمريره فى اللهب .
 - ٢- إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغمر منطقة الغشاء بمحلول صبغة كربول الفوكسين . سخن السطح السفلى من الشريحة حتى يتصاعد منها البخار (دون أن تغلى الصبغة) لمدة ٣-٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الصبغة بإضافة مزيد من الصبغة إذا لزم الأمر .
 - ٣- إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم تخلص من الصبغة بغسل الشريحة بالماء الجارى .
 - ٤- يضاف الكحول المحمض على الغشاء نقطة فنقطة عند أحد أطراف الشريحة مع إمالتها قليلاً ليتساقط منها الكحول المحمض المستعمل من الطرف الآخر إلى أن يصبح الكحول الحامضى المتساقط عديم اللون .
 - ٥- إغسل بالماء الجارى .
 - ٦- أصبغ الغشاء بمحلول الصبغة العكسية أزرق الميثيلين لمدة دقيقة .
 - ٧- تخلص من محلول الصبغة ثم أغسل الشريحة بالماء الجارى .
 - ٨- أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء، يمكن إسراع التجفيف بتعريض السطح السفلى للشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب مصباح بنزن .
 - ٩- ضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة ثم إفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملاً العدسة الزيتية . بين ما إذا كانت الخلايا مقاومة للأحماض أو غير مقاومة للأحماض . صف مع الرسم شكل ونظام تجمع خلايا البكتيرات المحضرة .
- وعلاوة على طرق الصبغ التفريقية السالفة الذكر فإن هناك طرقاً من الصبغ المركب تتبع لإظهار تركيبات خلوية حيث أن هذه التركيبات دون غيرها

تكون أكثر قابلية للإصطباج بصبغة معينة . ومن ضمن هذه الطرق صبغ الغلاف البكتيري، صبغ الأسواط البكتيرية، صبغ الجراثيم الداخلية .

صبغ الغلاف Staining of capsule

يحيط بجدار الخلية من الخارج منطقة هلامية لزجة يطلق عليها اسم الغلاف Capsule أو الطبقة الخارجية Outer layer ، أو الطبقة الهلامية Slime layer ويختلف سمك طبقة الغلاف هذه في البكتيرات المغلفة Encapsulated ، وقد لا توجد هذه الطبقة كلية بالبكتيرات غير المغلفة Nonencapsulated وفي معظم الحالات تتركب مادة الغلاف من عديدات التسكر polysaccharides . ومن المعروف أن طبقة الغلاف هذه يصعب صبغها بالطرق العادية، ولذا يفضل إستعمال طرق خاصة عديدة لصبغ الغلاف منها طريقة Anthony الآتى بيان خطواتها:

التمرين التاسع

- ١- حضر مزرعة حديثة من البكتيره *Klebsiella aerogenes* .
- ٢- حضر غشاء من المزرعة وأتركها لتجف في الهواء (لاستعمل الحرارة) .
- ٣- أصبغ الغشاء بمحلول مائي للكريستال البنفسجي لمدة ٢ دقيقة .
- ٤- تخلص من محلول الصبغة ثم اغسل الغشاء بمحلول كبريتات النحاس (٢٠٪) ، (لاستعمل الماء) .
- ٥- أترك الشريحة لتجف تماماً مرة ثانية في الهواء .
- ٦- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحص ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية .
- ٧- صف مع الرسم الخلايا وما يحيط بها من منطقة الغلاف -لاحظ أن الخلايا تظهر بلون أزرق غامق، بينما تظهر طبقة الغلاف كهالة زرقاء باهتة .

صبغ الأسواط Flagella staining

ترجع الحركة في معظم أنواع البكتيريا المتحركة إلى إمتلاك خلاياها أسواطاً في أطرافها أو على جانبها وحركة البكتيريا وعدد وتوزيع الأسواط على خلاياها تعتبر من الصفات الهامة المميزة للأنواع البكتيرية وتستغل في أغراض التصنيف.

وكان يعتقد أن الأسواط عبارة عن تركيبات هشة سهلة التلف، وأنه يلزم عند صبغها الإهتمام الزائد بعدم رج البيئة التي تنمو عليها البكتيريا، إلا أن الإتجاهات الحديثة تدل على أنها تركيبات صلبة تتحمل الرج والمعاملة بالطرد المركزي.

والمشكلة الحقيقية في صبغ الأسواط هو ضآلة سمكها الذي لايقع في نطاق القوة التمييزية أو التفصيلية Resolving power للميكروسكوبات الضوئية. وعلى ذلك فإن من أهم الخطوات التي تسبق عملية الصبغ إضافة بعض المواد التي تترسب على السوط لتزيد من سمكه بدرجة تجعل من الممكن مشاهدته بالميكروسكوبات الضوئية العادية إذا ما أجرى صبغه، ويعتبر حمض التانيك Tannic acid من أهم المواد المستعملة في هذا الغرض علاوة على أنه يعطى للأسواط قابلية أكثر على تقبل الأصباغ المستعملة، وهناك عدة طرق لصبغ الأسواط كلها تحتاج إلى خبرة ومران ودقة في العمل، إلا أن جميعاً تتفق في ضرورة إستعمال شرائح غاية في النظافة يستعمل لغسلها محاليل منظفة وحفظها نظيفة في كحول إيثايل ٩٠٪، والطريقة الآتية تعطى نتائج معقولة إذا ما أتبعنا بكل دقة.

التمرين العاشر

١- جهز مزرعة من البكتيره *Erwinia carotovora* ، وأخرى من *Agrobacterium tumefaciens* على آجار مائل . (عمر المزرعة يجب ألا يزيد عن ١٢-٢٤ ساعة) .

٢- أغمر سطح المزرعة بالماء المقطر ، مع التحريك الخفيف .

٣- انقل معلق الخلايا الخفيف جداً والمتكون بالأنبوبة إلى أنبوبة نظيفة أخرى ثم أترك الأنبوبة ١/٢-١ ساعة، في خلال ذلك الوقت يجرى تحضير الصبغتين أ، ب (أنظر قائمة الأصباغ والمحاليل بآخر الكتاب) .

٤- إنقل نقطة من معلق الخلايا إلى شريحة نظيفة (يلاحظ أن تأخذ النقطة من سطح المعلق حيث أن معظم الخلايا المتحركة تكون عند السطح) . ضع الشريحة مائلة قليلاً لتتحد نقطة معلق الخلايا على الشريحة مكونة غشاء ثم تترك الشريحة لتجف في الهواء .

٥- أغمر الشريحة بمحلول الصبغة (أ) لمدة ٦-٨ دقائق .

٦- تخلص من الصبغة على سطح الشريحة وذلك بصبها في الحوض المعد لذلك ثم اغسل الشريحة بالماء المقطر (إذا لم تغسل الشريحة جيداً بالماء المقطر فإنه ستتكون ترسيبات غامقة تعيق الفحص الميكروسكوبى) .

٧- أغمر الشريحة بالمحلول (ب) لمدة ٣٠ ثانية . ثم اغسل أيضاً بالماء

المقطر .

٨- أترك الشرائح لتجف في الهواء .

٩- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحص ميكروسكوبياً

بالعدسة الزيتية .

١٠- صف وارسم البكتيرات مبيناً شكل الخلايا وعدد ووضع الأسواط

على خلاياها .

صبغ الجراثيم Spore Staining

من المعروف أن الجراثيم الداخلية Endospores مقاومة بطبيعتها لتقبل الأصباغ فبالنّالى لايمكن لطرق الصبغ العادية التى تستعمل فى صبغ الخلايا الخضرية للبكتيريات أن تؤدى إلى صبغها، لذلك يستعان بطرق أخرى تستغل الحرارة لتسهيل إدخال الصبغة خلال جدر الجرثومة، وبمجرد دخول الصبغة إلى داخل الجرثومة فإنها تثبت بها ويصعب إزالتها منها، وهناك طرق عديدة لصبغ الجراثيم وقيما يلى وصفاً لطريقتين منها:

أولاً : طريقة شافر وفولتون : Shaeffer & Fulton

التمرين الحادى عشر (أ)

- ١- حضر غشاء من مزرعة *Bacillus subtilis* النامية على آجار مائل لمدة ٤٨ ساعة ثم ثبته بتمرير الشريحة فى اللهب عدة مرات.
- ٢- إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغمر سطح الشريحة بمحلول مائى لصبغة أخضر المالاكيت (٥%) ، وسخن الشريحة بتعريض سطحها السفلى للهواء الساخن فوق مصباح بنزن حتى يتصاعد البخار منها دون أن تغلى الصبغة، إستمر فى عملية التسخين لمدة ٤-٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الصبغة وذلك بإضافة مزيد من الصبغة كلما لزم الأمر.
- ٣- إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم إغسلها بالماء.
- ٤- أصبغ الغشاء بمحلول مائى للسفرانين لمدة دقيقة واحدة لصبغ الخلايا الخضرية.

٥- أغسل محلول الصبغة بالماء.

٦- أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء.

٧- إفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملاً العدسة الزيتية.

تظهر الجراثيم الداخلية خضراء فى حين أن الخلايا الخضرية وبقاياها المتصلة

بالجرثومة والتي يطلق عليها اسم الكيس الجرثومي *Sporangium* تكون حمراء اللون . إرسم بعضاً من الخلايا الخضرية والجراثيم مبيناً شكلها ووضع الجرثومة من الخلية الخضرية (طرفي، تحت طرفي، وسطي) وحجمها (مساوي أو أقل أو أكبر من قطر الخلية الخضرية) .

ثانياً : طريقة Dorner

التمرين الحادي عشر (ب)

١- حضر معلق كثيف من خلايا البكتيره *Bacillus subtilis* في ٢-٣ نقطة من الماء في أنبوبة إختبار صغيرة .
٢- أضف كمية مماثلة من كربول الفوكسين المرشح حديثاً إلى معلق الخلايا .

٣- ضع المخلوط في حمام مائي (١٠٠م) لمدة ١٠ دقائق .
٤- إخلط نقطة بسيطة من الخلايا المصبوغة مع نقطة صغيرة من محلول النيجروسين المشبع على شريحة نظيفة (هذا المحلول يجب أن يرشح قبل الإستعمال) ثم تفرد على الشريحة بحيث يتكون غشاء رقيق .
٥- أترك الغشاء ليجف ويفضل أن يجف الغشاء بسرعة وذلك بتعريض الشريحة للهواء الساخن فوق لهب بنزن .

٦- إفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملاً العدسة الزيتية .
الجراثيم تظهر حمراء اللون أما الخلايا الخضرية والكيس الجرثومي *Sporangium* فتكون شفافة في وسط رمادي أو أسود .
صف وإرسم البكتيره مبيناً شكل وحجم الجراثيم ومواضعها من الخلايا الخضرية التي تحملها .

الصبغة السالبة Negative Stain

راجع الدراسات المجهرية بالحقل المظلم والتمرين الثاني .

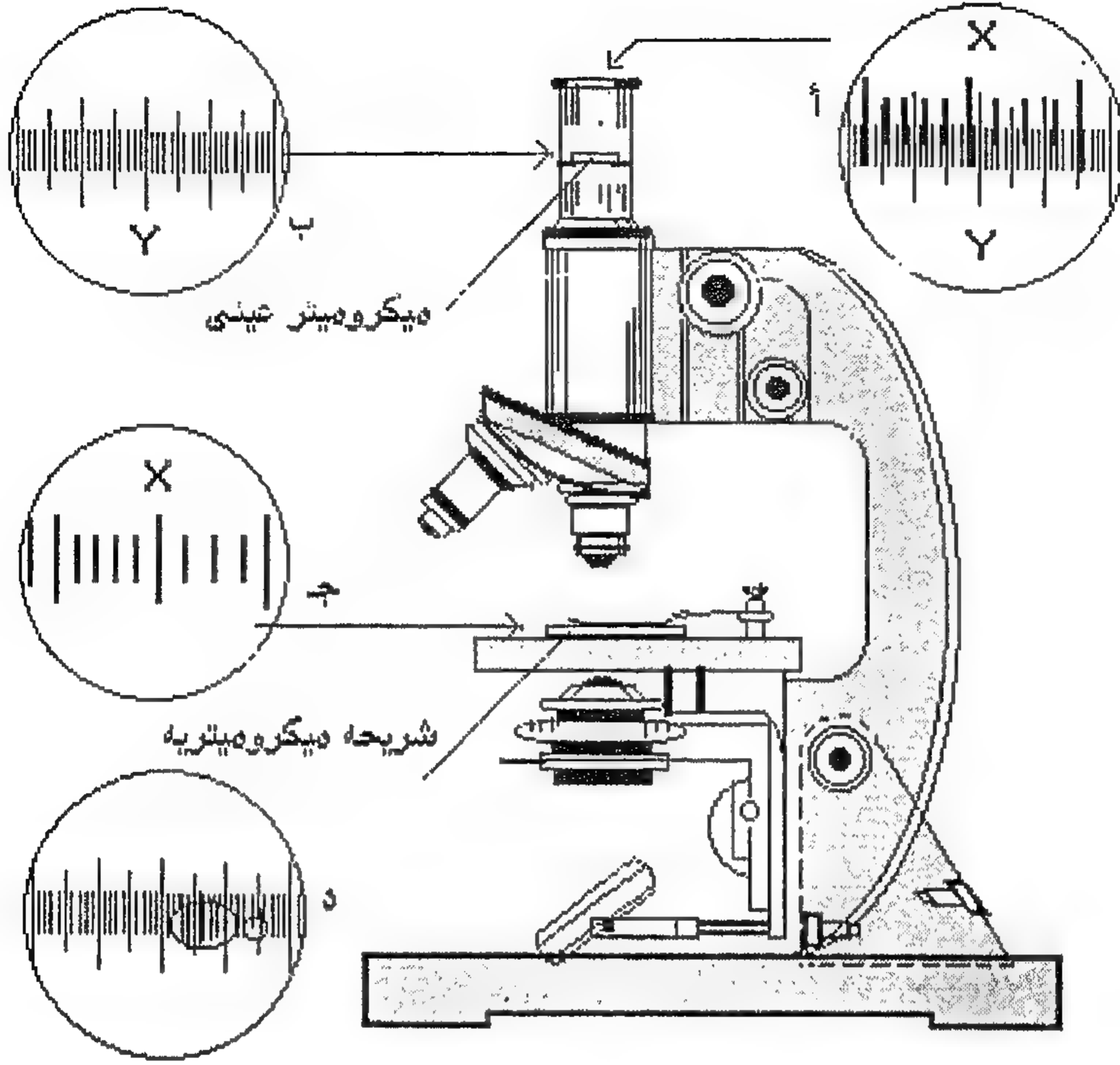
القياسات المجهرية

عندما تزود العدسة العينية بقرص يوضع في مكان مخصص له داخل العينية بعد فتحها وهذا القرص مدرج تدريجاً دقيقاً ويعرف بالميكروميتر العيني Ocular micrometer فإن الفاحص يمكنه أن يجري قياسات دقيقة بعد معايرة أقسام الميكروميتر العيني بالإستعانة بالميكروميتر الشئى المدرج تدريجاً معلوماً وتتم بها قياس البكتيرات كما سيأتى فيما بعد وتعتبر هذه القياسات (طول أو عرض) من الصفات التقسيمية الهامة للكشف عن التنوعات أو الاختلافات التى تطرأ على طول وعرض الكائن الدقيق إذا ما حدث ما يدعو إلى ذلك من ظروف بيئية . وهى أيضاً تتبع القياس حجم الجراثيم التى ينتجها الكائن سواء كانت داخلية أم خارجية وكذلك فى قياس الحوامل الجرثومية إن وجدت وشكل ١٢ يبين التدريجات التى تشاهد فى العدسة العينية للميكروميتر العيني وكذلك تلك التى تشاهد على الميكروميتر الشئى Stage micrometer وأخرى تبين تطابق التدريجين والتعرف على هذه التطابقات كمياً .

التمرين الثانى عشر

- ١- يوضع الميكروميتر العيني فى العدسة العينية وذلك يفصل الجزء العلوى منها ثم يوضع الميكروميتر بأنبوبتها مرتكزاً على المكان المخصص له ثم يعاد تركيب الجزء العلوى من العدسة إلى مكانه .
- ٢- ضع الميكروميتر الشئى Stage micrometer وهو عبارة عن شريحة على مسرح الميكروسكوب ثم حاول مشاهدة تقسيماتها بالعدسة الصغرى (التدريجات توجد بداخل دائرة سوداء) . ثم ثبت الشريحة بالماسكين .

- ٣- حرك القطعة الأنفية للمجهر لتجهز الشبيئية الكبرى للإستعمال حرك الضابط الدقيق حتى ترى التقسيمات بوضوح .
- ٤- ضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة الميكرومترية ثم حرك القطعة الأنفية لتستحضر العدسة الزيتية . حرك الضابط الدقيق حتى تنغمس الشريحة وترى أقسام التدرجين .
- ٥- حدد عدد أقسام الميكروميتر العيني المساوية لعدد أقسام الميكروميتر الشبئي (يلاحظ ضرورة إنطباق خطوط التدرجين على أبعد مسافة ممكنة) قدر عدد أقسام الميكروميتر العيني التى تقابل عدد أقسام الميكروميتر الشبئي فى المنطقة المختارة .
- ٦- وعادة يكون مسافة القسم الواحد من أقسام الشريحة الميكرومترية (الشبئية) مدوناً عليها وهو فى غالبية الأحوال يكون مساوياً ٠,١ من المليمتر أى ١٠ ميكرون وعلى ذلك يمكن تقدير طول التدرج الواحد من الميكروميتر العيني بإستعمال العدسة المغمورة بالزيت وإذا تساوى ٣ أقسام من الميكروميتر الشبئي مع عدد ٢٠ جزء من الميكروميتر العيني فالقسم الواحد من العينية = $3 \times 0,1 = 20 / 0,015$, مليمتر أو ١,٥ ميكرون .
- ٧- إرفع الشريحة ونظفها جيداً من الزيت وإحفظها فى مكانها المخصص ثم ضع الشريحة المراد دراستها مكانها وعليها نقطة من زيت السيدر وحرك الضابط الدقيق حتى ترى ما تود قياسه .
- ٨- حدد طول انجراثيم أو الخلايا بتقدير عدد أقسام الميكروميتر العيني المساوى للجزء المراد قياسه .



شكل ١٢: يوضح كيفية إجراء عملية معايرة أقسام

الميكروميتر العيني.

أ - بداية المعايرة ويلاحظ كل من تدريج الميكروميتر

العيني (Y) وتدرج الميكروميتر الشبكي (X).

ب - تدريج الميكروميتر العيني.

ج - تدريج الميكروميتر الشبكي.

د - قياس العينة.

تنمية البكتيريات

هناك مجالاً متسعاً من الإحتياجات الغذائية للبكتيريات المختلفة فبعضها يحتاج إلى بيئات غنية بالمواد الغذائية والبعض الآخر له متطلبات بسيطة من المواد غير العضوية ومما ذلك إلا للاختلافات في قدراتها التخليقية للمواد العضوية اللازمة لتغذيتها . ومنها ما يحتاج إلى كميات كبيرة من الأكسجين والبعض الآخر يهلك في وجود الأكسجين وذلك لإختلاف قدراتها التأكسدية الإختزالية . ولهذا التباين الملحوظ في إحتياجات هذه الكائنات من الغذاء والهواء فقد أوجد الباحثين طرقاً عديدة لتنمية هذه الكائنات بالمعمل كل طريقة منها تلائم كل مجموعة أو نوع من هذه الكائنات ولكي تنمى البكتيريات بالمعمل استعملت مخاليط أطلق عليها اسم البيئات media ومفردها بيئه medium تحتوى على الإحتياجات الغذائية اللازمة لتنمية كل مجموعة حسب إحتياجاتها من الغذاء وهذه البيئات إما أن تكون سائلة أو صلبة أو شبه صلبة عند إضافة مواد تصلبية إليها .

الإحتياجات الغذائية:

للحصول على أفضل نمو لكل مجموعة بكتيرية يجب أن نتفهم إحتياجاتها الرئيسية من الغذاء . والمتطلبات الغذائية للكائنات عموماً تتلخص في (الماء ، الكربون ، الطاقة ، النيتروجين ، المعادن وعوامل النمو) وفيما يلي مناقشه كل منها :

الماء : إن بروتوبلازم الخلية الحية يحتوى من ٧٣-٨٠ ٪ من الماء - والماء اللازم للكائنات ذات الخلية الواحدة تحصل عليه من البيئة الطبيعية التى تعيش عليها . والماء يدخل من الخلية محملاً بكل الجزيئات الغذائية الذائبة بالبيئة الطبيعية ويخرج منها محملاً بما تريد أن تخرجه الخلية وكل العمليات الإنزيمية

الكيمائية التي تتم بداخل الخلية تتم فقط في وجود كميات كافية من الماء، ونوعية الماء اللازم لتحضير بيئة لتنمية البكتيريا يعتبر من الأمور الهامة جداً، فمثلاً يجب عدم استعمال ماء الصنبور العسر أو المحتوى على أيونات الكالسيوم أو الماغنيسيوم، حيث أن وجود الفوسفات غير الذائبة وكذلك أيونات الكالسيوم أو الماغنيسيوم قد تؤثر على مدى صلاحية البيوتون أو خلاصة اللحم التي تضاف إلى البيئة، وأفضل المياه التي تستعمل في صناعة بيئات الزرع هو الماء المقطر.

الكربون : تنقسم البكتيريا إلى مجموعتين رئيسيتين فيما يختص بمصدر الكربون، مجموعة تستعمل الكربون الموجود في صورة ثاني أكسيد الكربون لبناء احتياجاتها من المواد الكربونية المعقدة وهذه تعرف بذاتية التغذية autotrophs أما المجموعة الثانية فهي تحتاج واحد أو أكثر من المواد العضوية للحصول على احتياجاتها من الكربون وهذه تعرف بغير ذاتية التغذية heterotrophs وبعض أفراد المجموعة الأخيرة هذه تحتاج علاوة على المواد الكربونية العضوية إلى ثاني أكسيد الكربون أيضاً فإذا منع هذا الغاز عنها كلية يتوقف نموها وخاصة في مراحل نموها الأولى والمواد العضوية الكربونية عديدة ومتنوعة كتتنوع الكائنات البكتيرية نفسها، فعندما يحتاج كائن بكتيري إلى مركب واحد من المواد الكربونية العضوية مثل حمض الخليك مثلاً فإن هناك كائن آخر قد يحتاج إلى العديد من المركبات العضوية على درجات مختلفة من التعقيد في تركيبها الكيماوي.

الطاقة : البكتيريا المحتوية على صبغات تجعلها ذات قدرة على استغلال الطاقة الشمسية يطلق عليها ذاتية التغذية ممثلة للضوء photoautotrophs أو photosynthetic autotrophs ، وعمل بيئات غذائية لتنمية هذا النوع من

البكتيريا لا تحتوي على أى مصدر للطاقة ، والبكتيريا ذاتية التغذية التى لا تستطيع الاستفادة من الطاقة الشمسية ولكنها تؤكسد مواد غير عضوية بسيطة تعرف بذاتية التغذية كيميائياً Chemoautotrophs أو Chemosynthetic autotrophs ، والمواد الضرورية المنتجة للطاقة لمثل هذه الكائنات تكون إما نيتريت أونترات أو كبريتات .

معظم البكتيريا تقع فى مجموعة غير ذاتية التغذية كيميائياً (Chemosynthetic heterotrophs) ، وهذه المجموعة تتطلب مصدراً عضوياً مثل الجلوكوز أو الأحماض الأمينية، والكمية من المواد المنتجة للطاقة اللازم إضافتها لبيئات زرع البكتيريا ذات التمثيل الكيماوى بنوعيتها تقدر بما لايزيد عن ٥ ٪ ، وهناك عدد قليل من البكتيريا يعرف بالبكتيريا غير ذاتية التغذية والممثلة للضوء photosynthetic heterotrophs أو photoheterotrophs ، وهذه الكائنات تحتوي على صبغات تمثل الطاقة الشمسية أو الضوئية للحصول على الطاقة ولكن يجب أن تحصل أيضاً على مصدراً عضوياً من الكربون مثل الكحول مثلاً .

النيتروجين : بالرغم من أن البكتيريا ذاتية التغذية يمكنها إستعمال مصادر غير عضوية من النيتروجين فإن البكتيريا غير ذاتية التغذية تحصل على حاجتها من النيتروجين من الأحماض الأمينية ومن المواد الوسطية فى تحلل البروتينات مثل البيبتيدات والبروتينوزات والبيبتون ، ومستخلص اللحم والبيبتون والتى تستعمل فى تحضير بيئات الزرع مثل المرق المغذى توفر النيتروجين اللازم لمعظم البكتيريا غير ذاتية التغذية التى تنمو عليها .

المعادن : كل الكائنات الحية بما فيها البكتيريا تحتاج إلى كميات ضئيلة من الأيونات المعدنية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والماغنسيوم

والمنجنيز والحديد والزنك والنحاس والفوسفور والكوبلت لكى تنمو طبيعياً وكما سبق القول أن الكميات اللازمة منها قليلة جداً، وهذه المعادن قد تدخل فى عمليات البناء أو التنفس أو تعمل كمرافقات إنزيمية.

عوامل النمو : إن أى مادة حيوية وضرورية لبناء وحياة الخلية والتي لا تقدر الخلية على تخليقها بنفسها من المصادر الكربونية والنيتروجينية البسيطة التي تتناولها تعرف بعوامل النمو، وهذه تشمل فيتامينات وأحماض أمينية معينة، والكثير من البكتيريا غير ذاتية التغذية تكتفى بما يحتويه مستخلص اللحم المضاف فى بيئة المرق المغذى من عوامل النمو إلا أن هناك بعض البكتيريا الممرضة الصعبة التتمة Fastidious heterotrophs تحتاج إلى بيئات أغنى غذائياً enriched مثل آجار الدم للحصول على العديد من عوامل النمو التي يحتاجها.

تركيز أيون الأيدروجين Hydrogen Ion Concentration : إن نمو

أى كائن بكتيرى يتوقف إذا لم تكن قيمة pH للبيئة فى حدود معينة، هذا وأن النظم الإنزيمية فى الخلية البكتيرية تتأثر كثيراً بقيمة pH البيئة، وحيث أن معظم البكتيريا تنمو جيداً على بيئات ذات pH حول 7، أو أقل قليلاً فإن قيمة pH البيئة المحضرة مثل بيئة المرق المغذى يجب أن يضبط على 6، 8، pH والكائنات الممرضة للإنسان والحيوان تفضل بيئات ذات قيمة pH تميل إلى القلوية.

أنواع بيئات الزرع

١- بيئات محددة التركيب الكيماوى *Chemically defined media*

وتعرف أحياناً بالبيئات التركيبية *Synthetic medium* وتتكون من مواد ذات تركيب كيماوى معروف . كأملاح غير عضوية ومركبات عضوية بسيطة على مستوى مرتفع من النقاوة ونظراً لأن مكوناتها تكون من نوعية معروفة ومشهود بتفاوتها فبذلك يمكن تكرار تحضيرها بالدقة المعتادة فى كل مرة من مرات التحضير ولعل ذلك من أهم مميزات هذا النوع من البيئات وإستعمالها بإستمرار فى دراسة الإحتياجات الغذائية الأخرى التى قد تضاف إليها لتنمية البكتيريات ومثل هذه البيئات قد تباع بالأسواق مجهزة فى صورة مسحوق يذاب كمية محددة منه إلى لتر من الماء المقطر للحصول على بيئة سائلة أو بيئة قابله للتصلب .

٢- بيئات غير محدودة التركيب الكيماوى *Chemically non defined media*

ويطلق عليها أيضاً بيئات غير تركيبية *non synthetic media* تتكون من مكونات غير معروف التركيب الكيماوى لها على وجه الدقة فكل من مستخلص اللحم والبيتون على سبيل المثال والتى تدخل فى تصنيع بيئة المرق المغذى لازل تركيبهما الكيماوى غير معروف على وجه الدقة فهذا التركيب الكيماوى يختلف باختلاف المصادر الطبيعية المستعملة فى تحضيرها فذلك كان من الصعب تكرار تحضير هذه البيئات بنفس التركيب وبنفس الدقة .

٣- البيئات المجففة *Dehydrated media*

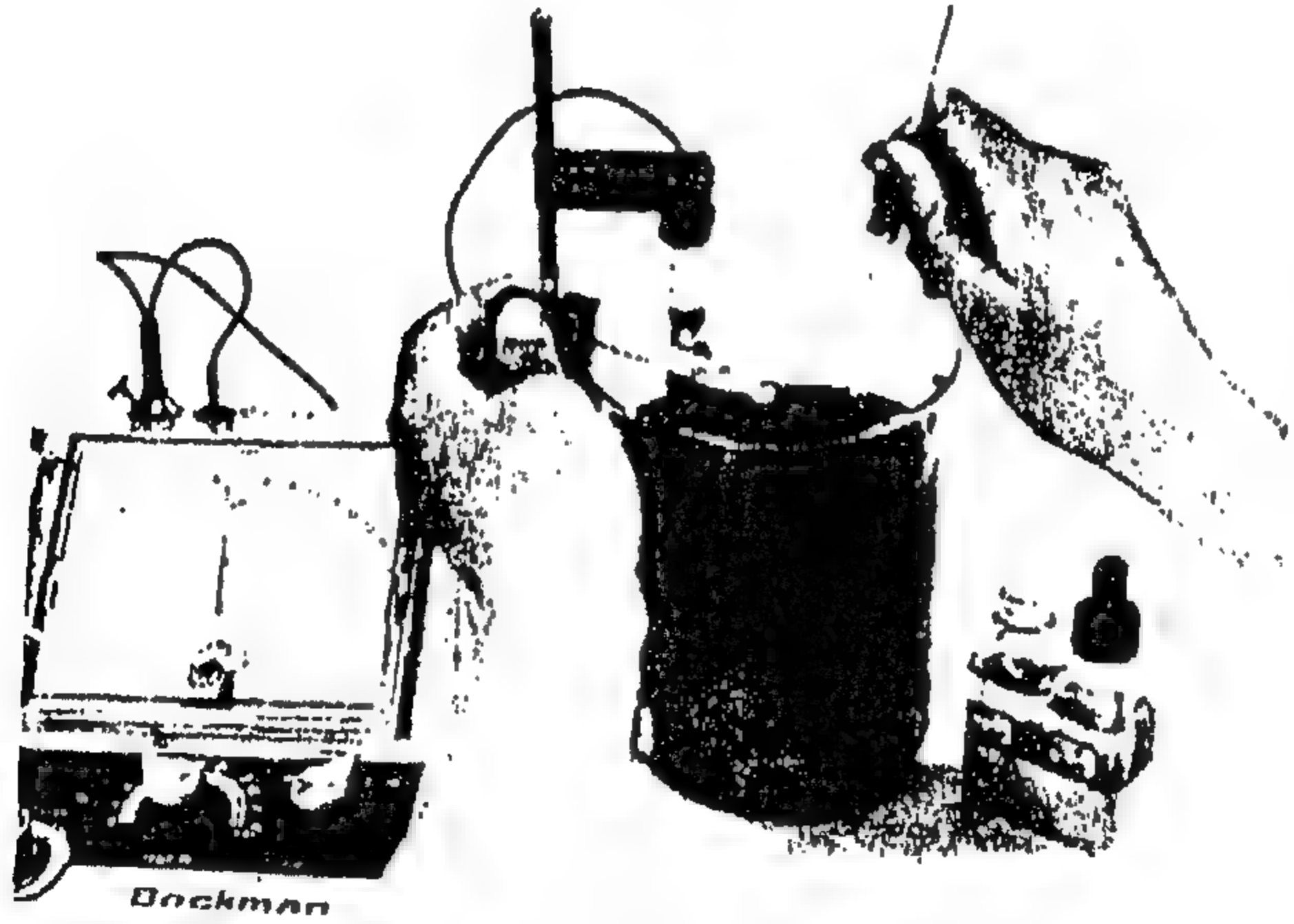
كان الدارسين فيما مضى يضيعون كثير من الوقت فى تجهيز بيئات زرع البكتيريات لأنهم كانوا يستخلصون بأنفسهم المواد الأولية المختلفة التى تدخل فى تركيب البيئات .

فإذا ما إحتوت البيئة على خمسة أو ستة مكونات فكان على الدارس تحضير البعض منها بنفسه مثل مستخلص اللحم أو مستخلص البطاطس أو مستخلص الخميرة وهذه تتطلب طرق طويلة ومجهدّة ، والآن فإنه توجد بالأسواق جميع أنواع بيئات الزرع مجففة dehydrated ، فأصبح تجهيزها للعمل من الأمور الميسرة ويلاحظ على كل عبوة من هذه البيئات المكونات الرئيسية لها والتعليمات الخاصة بتحضيرها فما على الباحث إلا أن يضيف كمية الماء المقطر على الكمية المقررة من المسحوق ثم يقاس قيمة الـ pH ليتأكد منه وهو عادة ما يكون محسوباً ومضبوطاً ثم يصب البيئة فى الأنابيب أو الدوارق لتعقم . وتباع بالأسواق كل أنواع البيئات مجففة والتي يتطلبها البحث مثل بيئات الحد الأدنى، بيئة المرق المغذى، الآجار المغذى والجلوكوز، البيئات الإنتخابية Selective media التي يكون مضافاً إليها أنواع معينة من المواد الكيماوية لمنع تنمية مجموعة معينة من البكتيريات والسماح للمجاميع الأخرى وكذلك البيئات التفريقية Differential media مثل بيئة آجار الدم والتي تفرق بين البكتيريات المحللة للهيموجلوبين عن غيرها . وكذلك بيئات التقدير الحيوى للفيتامينات Vitamin assay media وبيئات تقدير أعداد الخلايا البكتيرية وبيئات التعرف على البكتيريات وغيرها .

وقد تكون البيئة المجففة مجهزة لتحضير بيئة سائلة أو مجهزة لتحضير بيئة صلبة والأخيرة يكون مضافاً إليها الآجار آجار بالنسبة المقررة وهى عادة ٢٪ أو مضافاً إليها حمض السلسليك بالنسبة المقررة لتحديد الشكل الهلامى المتصلب على درجة حرارة الغرفة أو شبه صلبة بإضافة الجيلاتين بالنسبة المقررة أيضاً .

ضبط قيمة pH البيئة

بالرغم من أن كل البيئات المجففة والمجهزة تكون محتوية على عوامل تنظيمية للحموضة Buffering aqueul إلا أن قيمة pH البيئة المحضرة منها تكون مختلفة عن تلك المبينة على بيانات العبوة ، لذلك فقبل أن تعبئ البيئة في الأنابيب أو الدوارق عليك بتقدير قيمة الـ pH لها ، ثم يجرى لها ضبط للدرجة المرغوبة ، وتستعمل لذلك جهاز قياس pH إلكترونى والذي يجب أن يختبر بالإستعانة بمحلول Buffer معروف قيمة الـ pH له ثم يعدل قيمة pH البيئة بإضافة محلول من الصودا الكاوية قوة واحد أساسى إذا أريد زيادة الـ pH نقطة نقطة مع التقليب أو محلول من حمض الهيدروكلوريك واحد أساسى نقطة نقطة إذا أريد تقليل قيمة pH ، وتقرأ القيمة بالجهاز بعد إضافة نقطتين من أى من المحولين فى المرة الواحدة ، حتى تنضبط قيمة pH (شكل ١٣) .



شكل ١٣ : قياس تركيز أيون الأيدروجين بالبيئه بعد ضبطه
 بإضافة عدة نقط من الحمض أو القلوى مع التقليب المستمر .

التمرين الثالث عشر (أ)

أولاً : تحضير لتر من بيئة المرق المغذى

- ١- ضع ٣ جم مستخلص لحم + ٥ جرام مسحوق ببتون فى وعاء زجاجى نظيف .
- ٢- أضف لتر ماء مقطر للمكونات السابقة فى الوعاء مع خلطها جيداً حتى الإذابة .
- ٣- أسحب بواسطة ماصة كمية ١٠ مل من البيئة وقدر قيمة الـ pH بها .
قدر الكمية اللازمة من الحمض أو القلوى اللازمة لضبط الـ pH فى ٩٩٠ مل من البيئة ثم أضف الكمية من الحامض أو القلوى اللازمة لضبط الـ pH إلى ٢ , ٧ .
- ٤- صب البيئة فى أنابيب أو دوارق مناسبة بإستعمال قمع التعبئة .
- ٥- غطى الأنابيب أو الدوارق بسدادات من القطن أو المعدن أو البلاستيك حسب ما يتوفر لديك بالمعمل .
- ٦- ضع الأنابيب فى الأسبته السلكية الخاصة بها .
- ٧- ضع الأسبته فى الأوتوكلاف بعد التأكد من طريقة إستعماله ثم عقم الأنابيب لمدة ٢٠ دقيقة على درجة حرارة ١٢١°م وضغط ١٥ رطل/البوصة المربعة .
- ٨- بعد إنتهاء المدة المقررة إقفل الأوتوكلاف وأترك الضغط ينخفض إلى الصفر ثم إفتحه وإستخرج محتوياته .

التمرين الثالث عشر (ب)

ثانياً : تحضير لتر من بيئة الآجار المغذى

- ١- حضر بيئة المرق المغذى بالطريقة السابقة.
- ٢- بعد ضبط قيمة الـ pH إلى ٢,٧ أضف ٢٠ جم من مادة الآجار
آجار* ثم ضع الوعاء على حمام مائى على درجة ١٠٠°م حتى يتم إنصهار
الآجار.
- ٣- عبيء البيئة فى أنابيب بواسطة قمع التعبئة (يراعى السرعة
حتى لا تتصلب البيئة على القمع وتسده) كما يراعى ملئ ٣/٢ الأنبوبة إذا أريد
الحصول على آجار عميق deep أو ٣/١ الأنبوبة إذا أريد الحصول على آجار
مائل slanted كما يمكن تعبئتها فى دوارق أو زجاجات أيضاً.
- ٤- تسد الأنابيب كالمعتاد وتوضع فى الأسبته.
- ٥- تعقم فى الأوتوكلاف كما سبق فى تحضير المرق المغذى.
- ٦- بعد إخراج الأنابيب المعدة لعمل الآجار المائل تمال الأنابيب
وتوضع قممها على جزء مرتفع للحصول على السطح المائل ويراعى أن
لا تصل البيئة إلى السدادات القطنية وتترك لتتصلب فى هذا الوضع.

*تضاف مادة الآجار آجار كمادة تصلبية فى هذه البيئة وهى تسال على
درجة الغليان ثم تتصلب على درجة ٤٢°م . وهو عبارة عن مادة كربوأيديراتية
تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء من نوع Gelidium - وغالبية الكائنات
لا تحمله كما أنه لا يتأثر بدرجة حرارة التعقيم بالأوتوكلاف إلا إذا كان تفاعل البيئة شديد
الحموضة أو القلوية.

الصفات المزرعية Cultural characteristics

تشمل الصفات المزرعية للكائن البكتيري المظهر المرئى بالعين المجردة للنمو فوق أو فى بيئات الزرع المختلفة . هذا والصفات المزرعية التى إعتدناها مرجع بيرجى يجب أن تدرس وتوصف لكل كائن بكتيري يراد التعرف عليه . والبيئات المعتمدة للدراسات المزرعية هذه هى بيئتى الآجار والمرق المغذى وكذلك الجيلاتين المغذى . ولدراسة بعض البكتيرات المجهولة وخصوصاً المعزولة من الأنسجة الحيوانية يستحسن إضافة بيئة آجار الدم .

أولاً : النمو على بيئة الآجار المغذى المائل

لاحظ ما يلى كما فى شكل ١٤ ودونه .

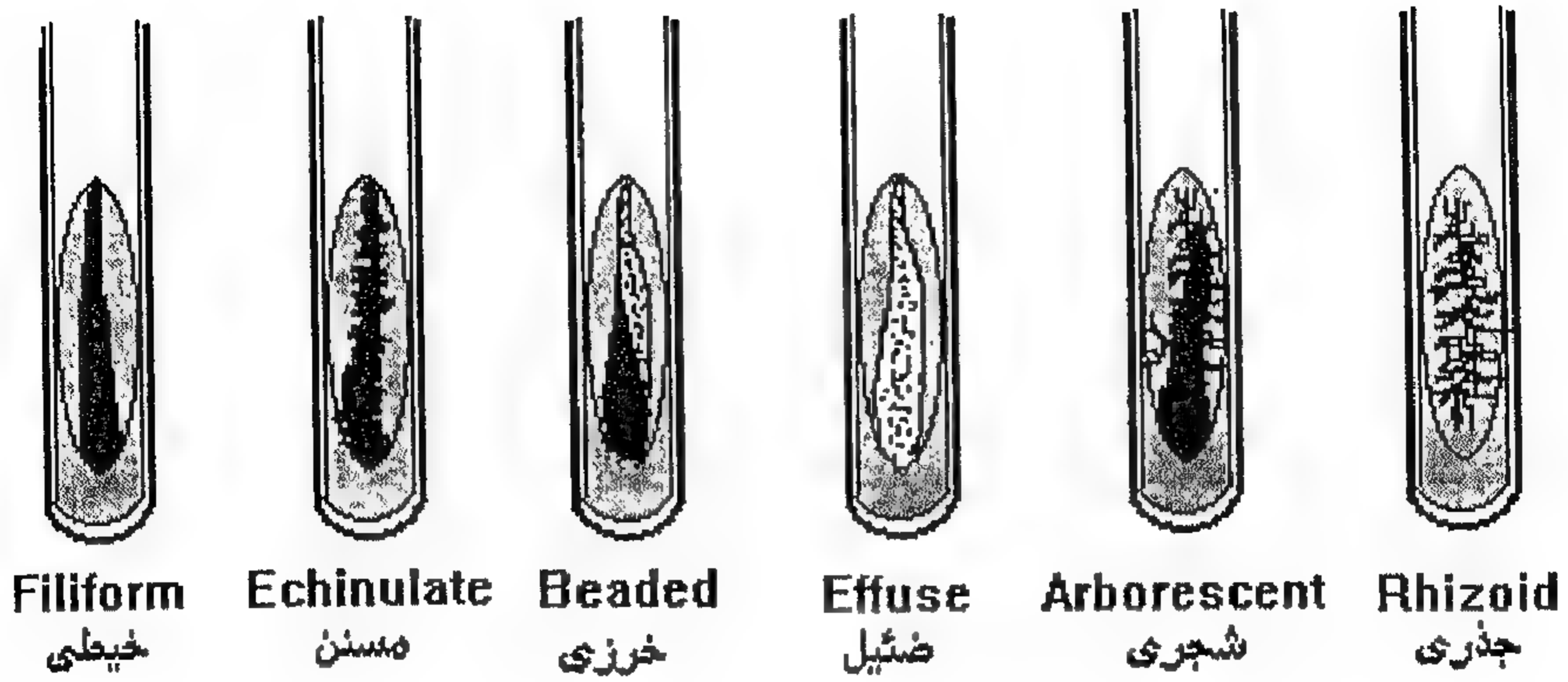
١- كمية النمو فوق الآجار المائل : وهى إما أن تكون خفيفة أو متوسطة أو غزيرة أو لا يوجد نمو على الإطلاق .

٢- لون النمو : يجب ملاحظة الصفات المصاحبة للنمو كاللون إما داخل البيئة نفسها أو على النمو فقط - معظم البكتيرات يظهر نموها باللون الأبيض والبعض الآخر قد يبدى درجات مختلفة من التلوين - بعض البكتيرات تكون صبغات قابلة للذوبان فى الماء تنتشر فى البيئة . لذلك يجب أن توضع المزرعة أمام ضوء قوى للبحث عن الصبغات المنتشرة فى البيئة .

٣- الشفافية : الكائنات التى تنمو بغزارة على الآجار المائل تبدو معتمة عن تلك التى تعطى نمواً خفيفاً، ودرجة الشفافية يمكن أن توضح كالاتى:-

معتم - شفاف - شفاف جزئياً translucent .

٤- الأشكال المختلفة لقوام النمو موضحة فى الشكل الآتى (شكل ١٤) .



شكل ١٤- الأشكال المختلفة للنمو على الآجار المائل.

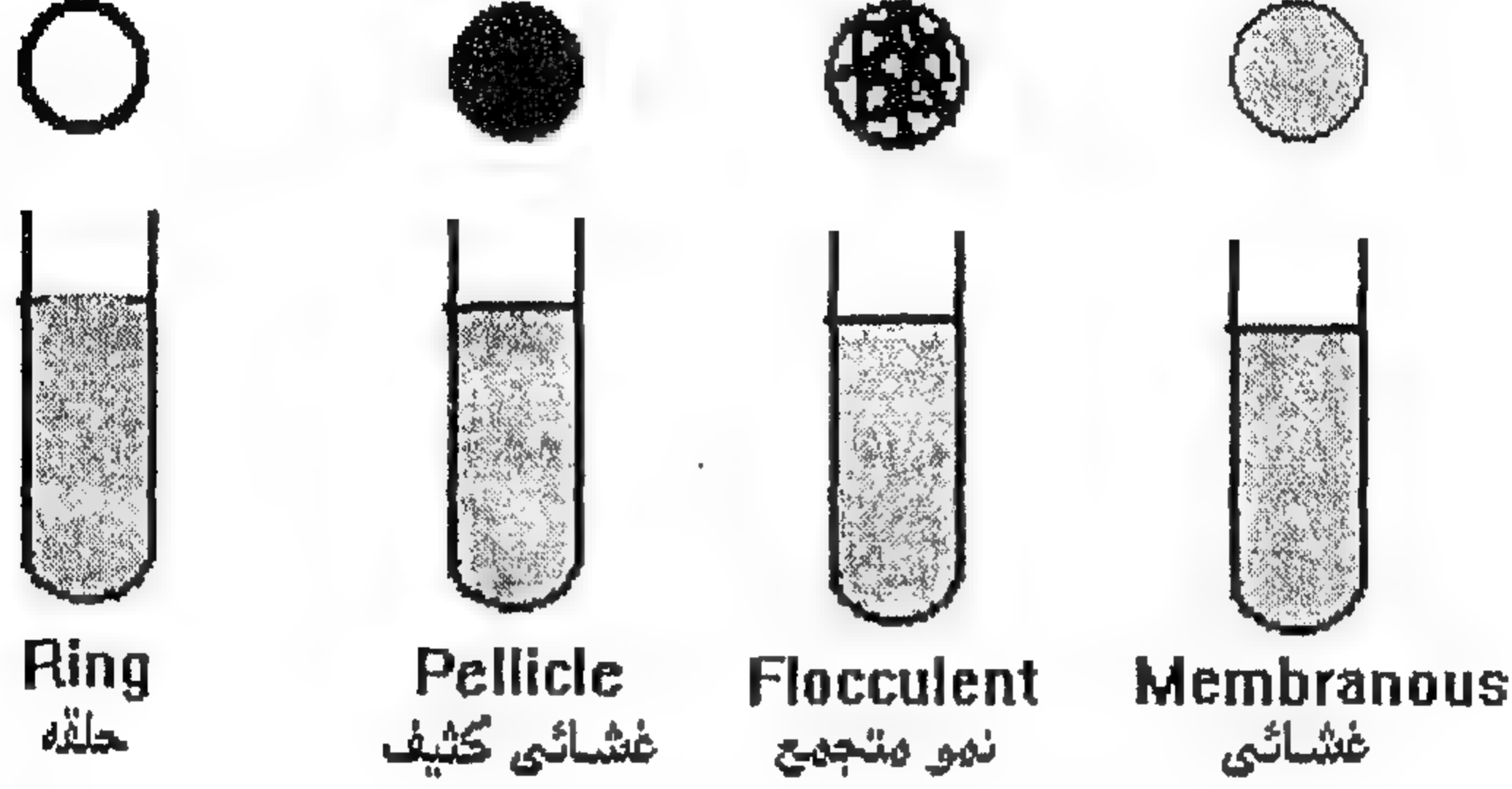
- النمو الخيطي Filiform يتميز بانتظام النمو على طول خط التلقيح.
- النمو المسنن Echinulate حواف النمو تظهر بموجات مسننة.
- النمو الخرزى Beaded مستعمرات صغيرة منفردة أو شبه متصلة على طول خط التلقيح.
- نمو ضئيل Effuse النمو خفيف بشكل نقط صغيرة منتشرة بدرجة غير منتظمة.
- نمو شجري Arborescent نمو بكتيري (يشبه جذع الشجرة) يخرج منه تفرعات تشبه أفرع الأشجار.
- نمو جذري Rhizoid النمو البكتيري يشبه تفرعات الجذور النباتية.

ثانياً : النمو على بيئة المرق المغذى

يلاحظ طبيعة النمو على سطح البيئة وعلى المنطقة تحت السطحية وكذلك النمو فى قاع البيئة وذلك لتحديد الاحتياجات الأكسوجينية و هى كما يلى :

١- سطح المزرعة فيما يلي (شكل ١٥) يبين أشكال النمو السطحي على

البيئة السائلة .



شكل ١٥: النمو السطحي على البيئة السائلة بالأنابيب .

٢- تحت السطح يمكن وصف تحت سطح البيئة السائلة بأنه عكر أو يكون حبيبي granular إذا ما شوهدت جزيئات صغيرة عالقة به، أو طيفي إذا ما شوهدت أجسام عائمة كبيرة الحجم تتحرك تحت السطح (flocculent)، أو صفيحي flaky إذا شوهدت صفائح صغيرة عائمة به .

٣- الرواسب (قاع الأنبوبة) إن كمية الرواسب في قاع الأنبوبة تختلف بين غائبة أو غزيرة ولكي توصف هذه الرواسب ترج الأنبوبة بترك الرواسب لتشتت ويمكن وصف الرواسب حبيبية granular، طيفية flocculent أو صفيحي flaky أو لزجة Viscid واختبار الكثافة (اللزوجة) يحرك الراسب بإبرة تلقح معقمة .

ثالثاً: تقدير كمية النمو على البيئة السائلة:

لإجراء ذلك يجب رج الأنبوبة لنشر النمو ثم تقدر كمية النمو بأنها خفيفة- متوسطة- غزيرة .

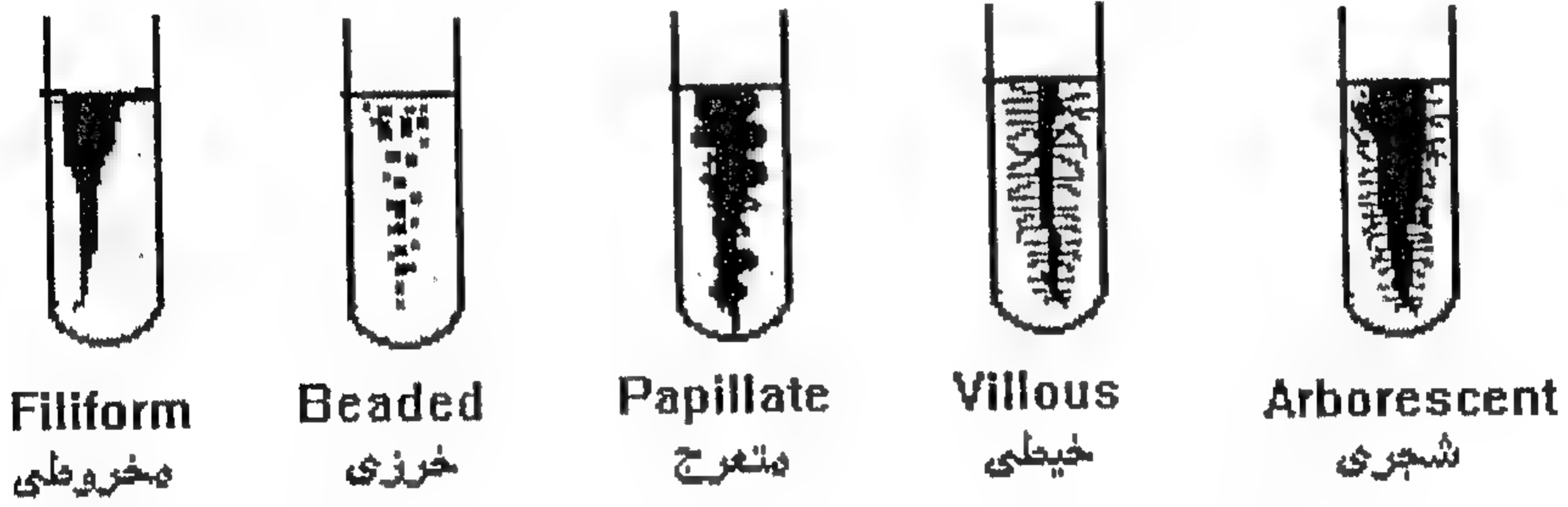
رابعاً: النمو فى بيئة الجيلاتين العميق Gelatin stab culture

إذا ما حدث نمو فى بيئة الجيلاتين المغذى العميق فإننا نبحث عن أمرين :

أ- نوع النمو وشكله .

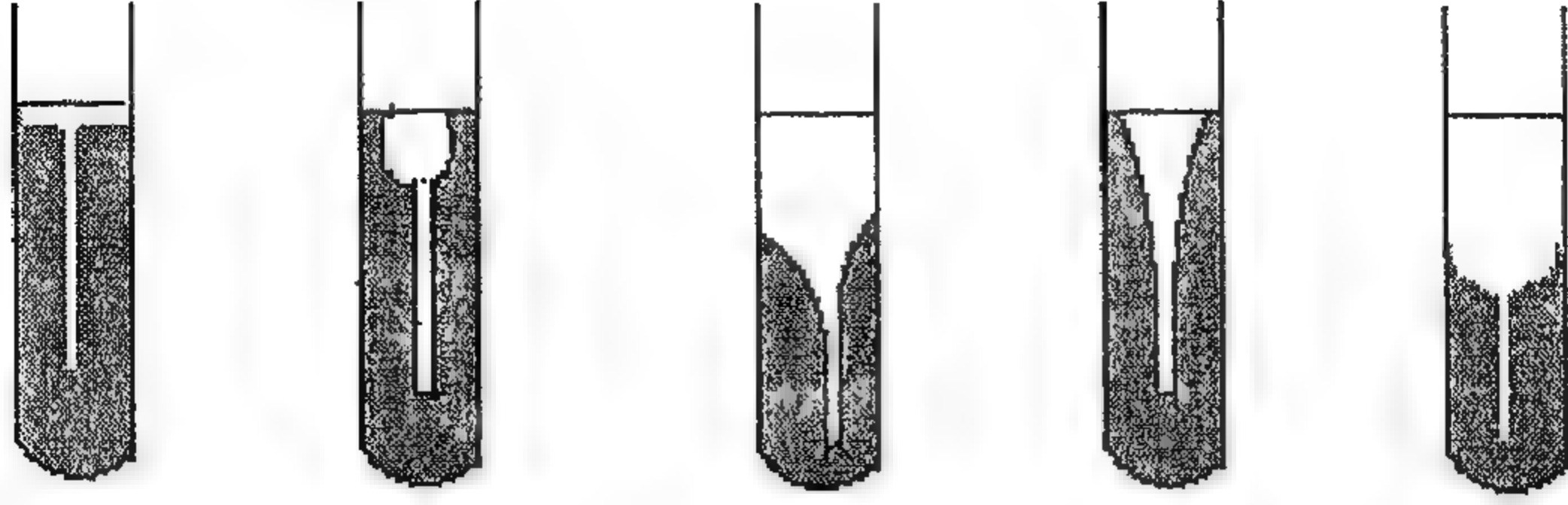
ب - حدوث إسالة للجيلاتين من عدمه وذلك بعد تبريد الأنبوبة لمدة ٥ دقائق حتى لا تكون الإسالة ناتجة عن إرتفاع درجة الحرارة .
أ- نوعية النمو بصرف النظر عن الإسالة :

لا يمكن لكل البكتيريات أن تنمو على بيئة آجار الجيلاتين ولكن إذا حدث نمو بدون إسالة للجيلاتين فقد يظهر كواحد من الأشكال الآتية: (شكل ١٦)



شكل ١٦: الأشكال المختلفة من النمو البكتيرى فى بيئة جيلاتين عميق ملقح بالوخز (فى حالة عدم حدوث التحلل).

ب - بعض البكتيريات تفرز إنزيم gelatinase والذى له القدرة على هضم الجيلاتين وتحليله وعندما يتحلل الجيلاتين فى البيئة فإنها تفقد تماسكها ويحدث لها الإسالة له بجملة أشكال كما هو مبين بشكل (١٧) .



Crateriform Napiform Infundibule Saccate Stratiform
طبقي لفتي قمعي زقي كأسى

شكل ١٧: أنواع تحلل أو إسالة الجيلاتين .

الطبقي crateriform إسالة بشكل طبق الفنجان .

الفتي Napiform إسالة بشكل جذر الفت .

القمعي Infundebuleform إسالة بشكل القمع .

زقي أو Saccate إسالة بشكل الجيب أو الكيس الطويل .

الكأسى Stratiform إسالة لكل الجيلاتين تبدأ من جدر الأنبوبة إلى

أسفل . إذا حدث ولم يبق النوع البكتيري بإسالة الجيلاتين ضع الأنبوبة بالحضانة
ثانية لمدة ٤-٥ أيام فقد تحدث إسالة ثانوية .

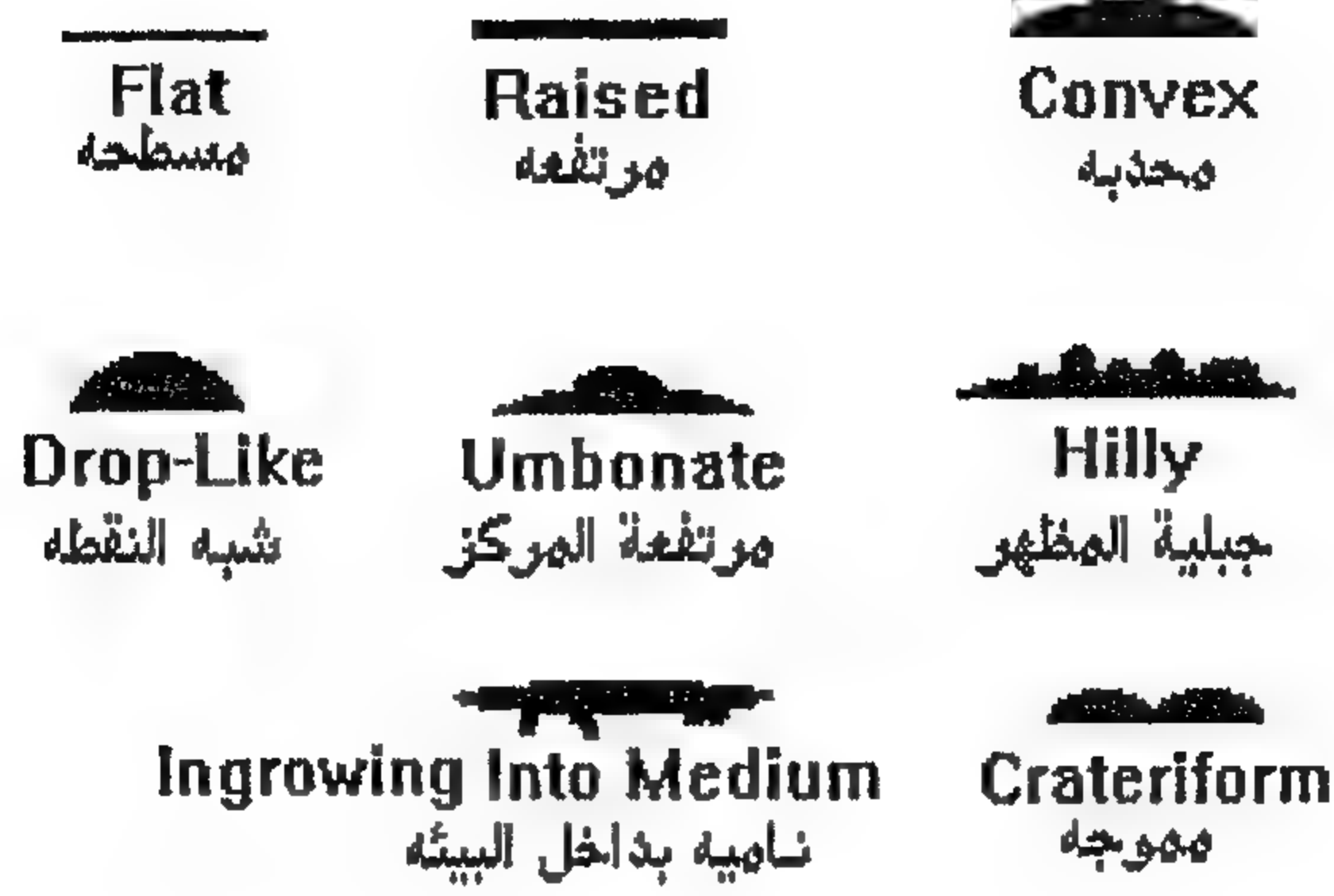
خامساً : النمو على بيئة الآجار بالأطباق

إن المستعمرات التي تنمو على سطح بيئة الآجار المغذى يجب أن تدرس
أيضاً من ناحية لونها، شفافيتها، قوامها، ارتفاعها، عن سطح البيئة وشكل
حوافها . أنظر إلى (شكل ١٨ ، ب) .

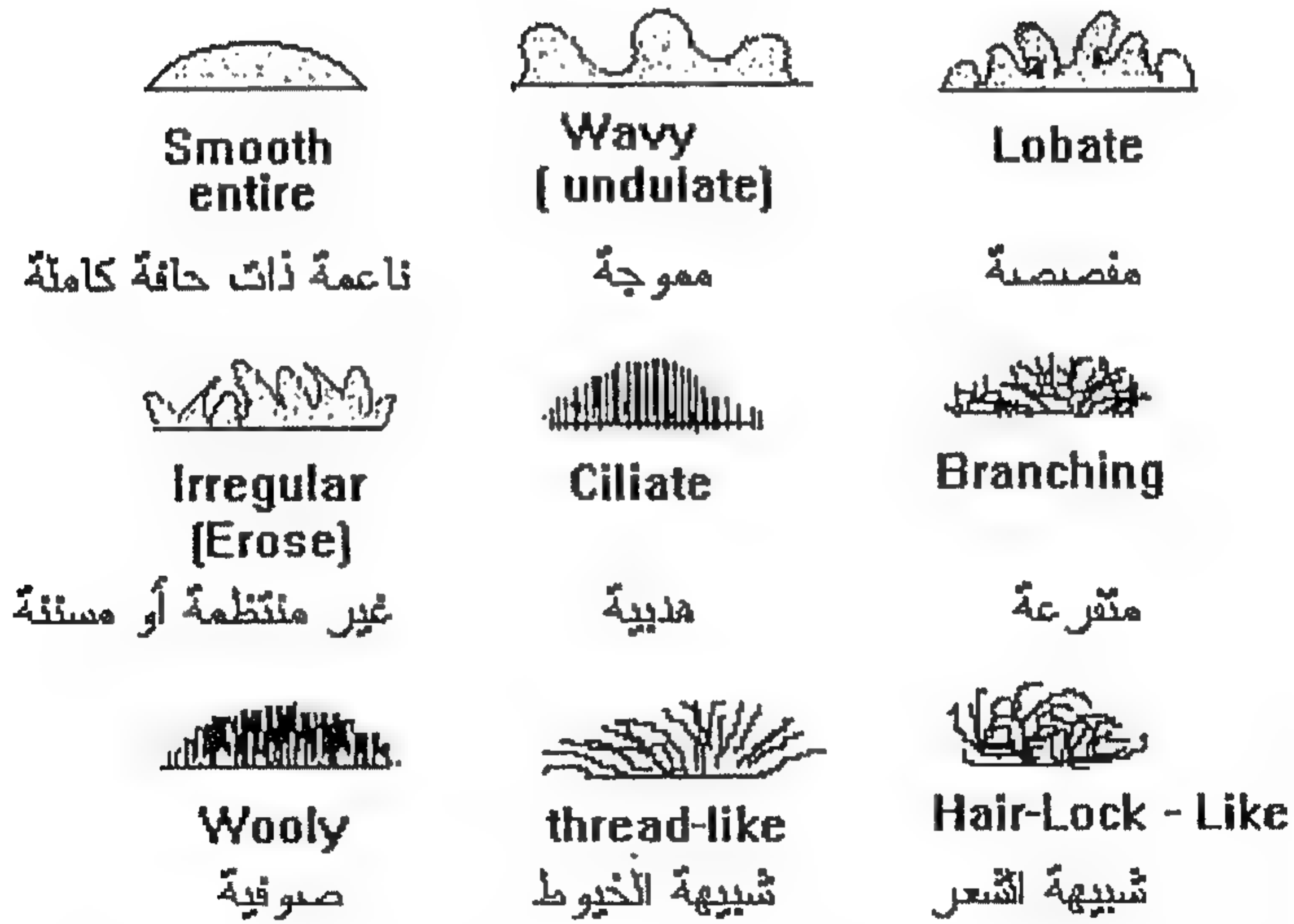
التمرين الرابع عشر

- ١- أفحص المستعمرات النامية بالأطباق التي أمامك .
- ٢- أفحص النمو البكتيري على بيئتي المرق والآجار المغذى .
- ٣- أفحص النمو البكتيري في بيئة الجيلاتين العميق .
- ٤- دون ملاحظتك مع الرسم بالاستعانة بالأشكال التالية .

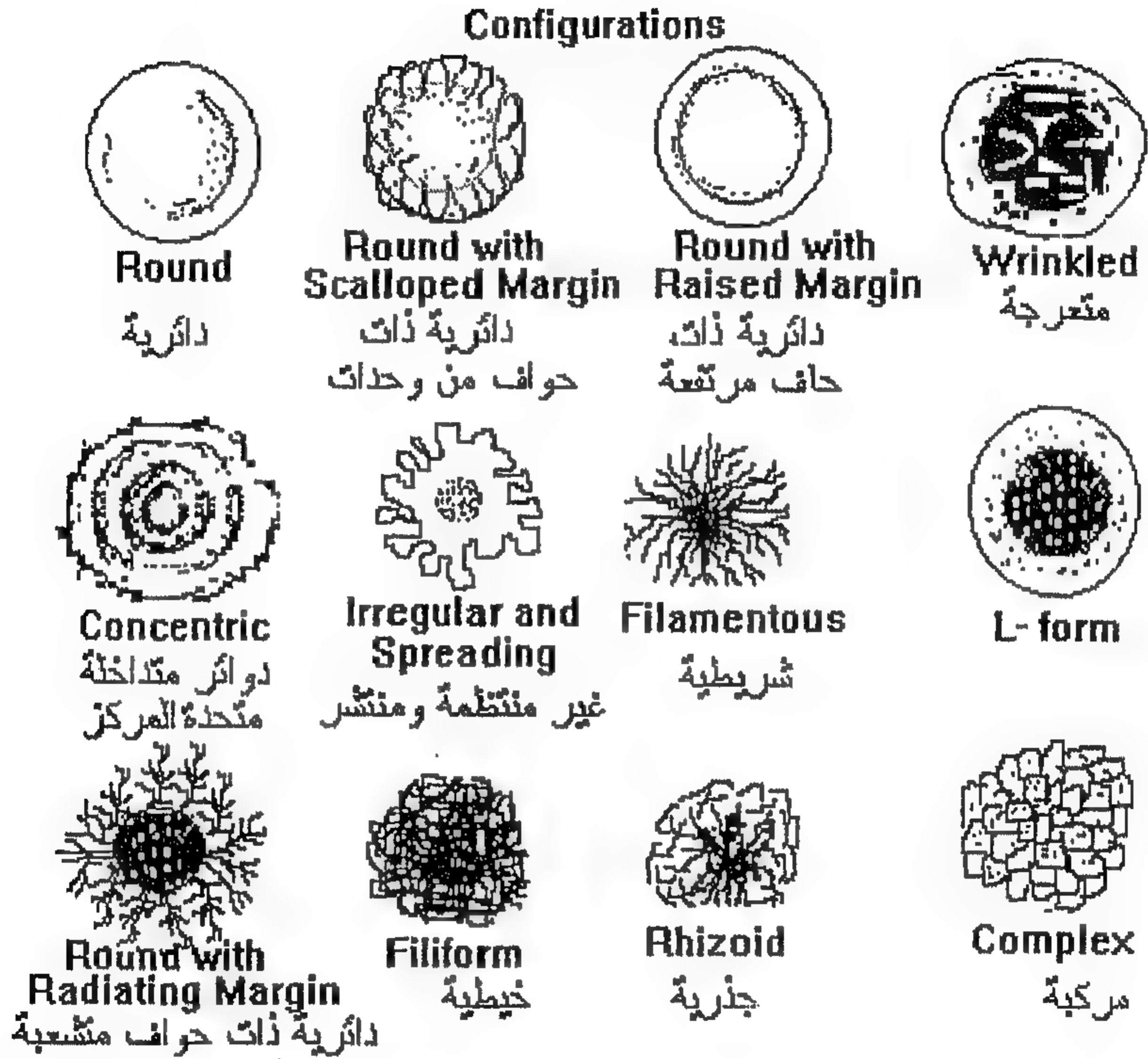
الأرتفاع Elevations



الأحواف Margins



شكل ١١٨ : الأشكال المختلفة لارتفاع وحواف مستعمرات البكتيرات النامية على بيئة آجار بالأطباق .



شكل ١٨ ب : الأشكال المختلفة التي تبين الـ Configuration

لمستعمرات البكتيريا النامية على بيئة آجار بالأطباق .

التعقيم Sterilization

إن معظم الدراسات الميكروبيولوجية تعتمد على المزارع النقية أى التى ينمو بها نوع واحد من الكائنات الدقيقة ، وهذه تتطلب لنموها بيئات غذائية معقمة . والتعقيم عبارة عن العمليات التى من شأنها قتل أو إزالة كل الكائنات الحية الدقيقة من الوسط المراد تعقيمه سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة أو أماكن أو مسطحات محدودة فى أبعادها وأحجامها ، والأشياء المعقمة يمكن الاحتفاظ بها على صورة معقمة طالما أمكن إبعادها عن التلوثات الخارجية .

وعادة يتم التعقيم بإتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية .

الطرق الفيزيائية Physical methods

تعتبر الحرارة المرتفعة وكذلك بعض الإشعاعات من أهم العوامل الفيزيائية التى تستعمل فى أغراض التعقيم، غير أن التعقيم الحرارى هو أكثر طرق التعقيم شيوعاً .

أولاً : الحرارة

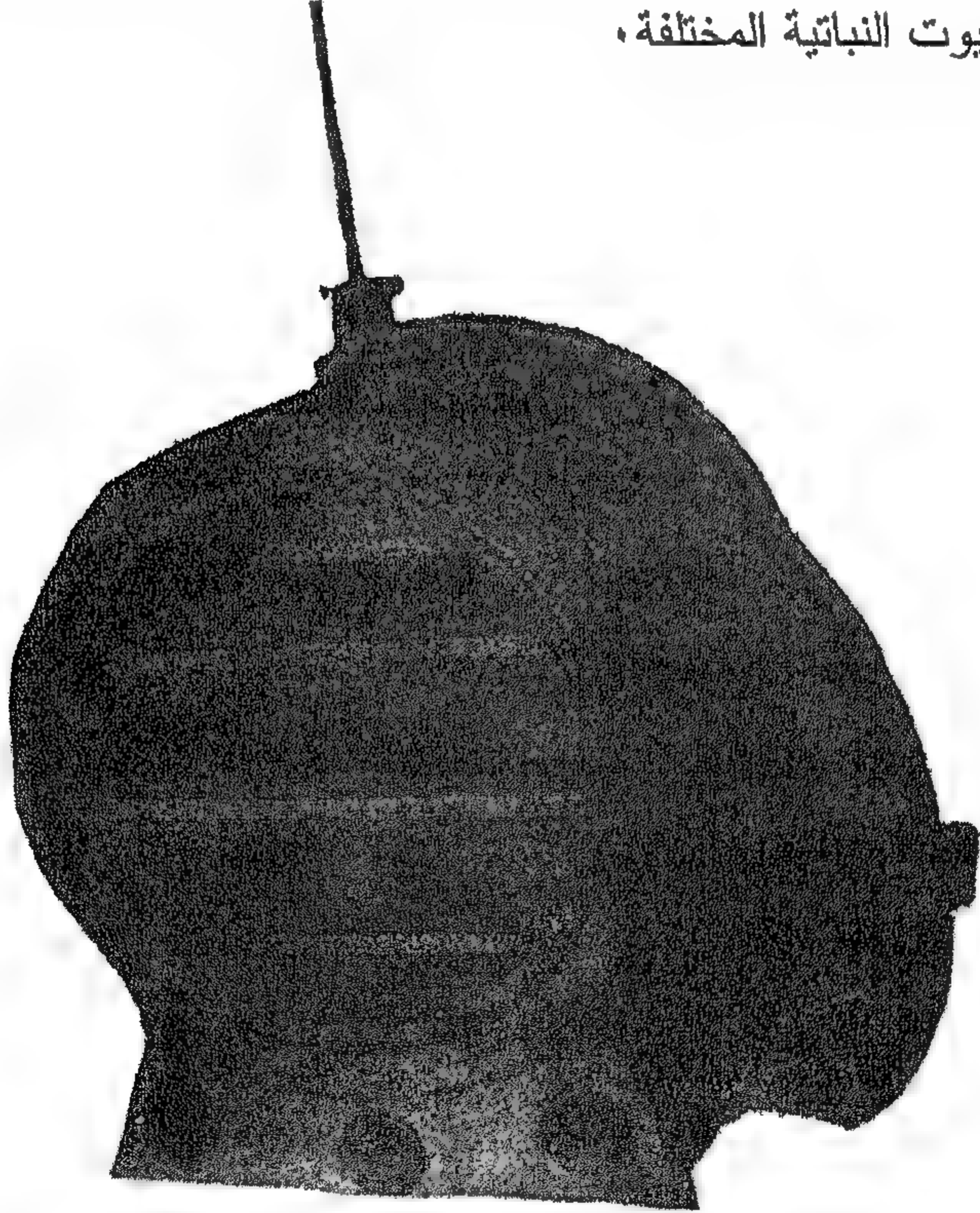
(أ) التعقيم بالحرارة الجافة: Dry heat sterilization

١- أفران الهواء الساخن: Hot air ovens

يستعمل فى هذا الغرض أفران تعرف بأفران الهواء الساخن يسخن فيها الهواء كهربياً (شكل ١٩) ، أو بإستعمال الغاز ، فترتفع درجة حرارة الهواء المحيط بالأدوات المراد تعقيمها حتى تصل إلى درجة تتراوح بين ١٦٠-١٨٠م ويترك هكذا لمدة تتراوح بين ٢-٣ ساعات يتم بعدها التعقيم .

ويتم قتل الكائنات الحية الدقيقة التي تكون ملوثة للأدوات المعقمة بالحرارة الجافة، نتيجة للتجفيف السريع الذي يطرأ على خلاياها، وكذلك نتيجة لأكسدة المحتويات الخلوية الجافة.

وتتبع هذه الطريقة في تعقيم الأدوات الزجاجية مثل أنابيب الاختبار، والماصات والدوارق الفارغة وأطباق بترى وغيرها من الأدوات الزجاجية الأخرى التي يرغب في تعقيمها. ويجب ملاحظة أن هذه الطريقة لا تتبغ في تعقيم كل ما يخشى عليه من الجفاف مثل البيئات الغذائية والمحاليل المائية وغيرها ولكن يمكن إتباعها في تعقيم بعض الزيوت المعدنية مثل زيت البرافين وكذلك الزيوت النباتية المختلفة.

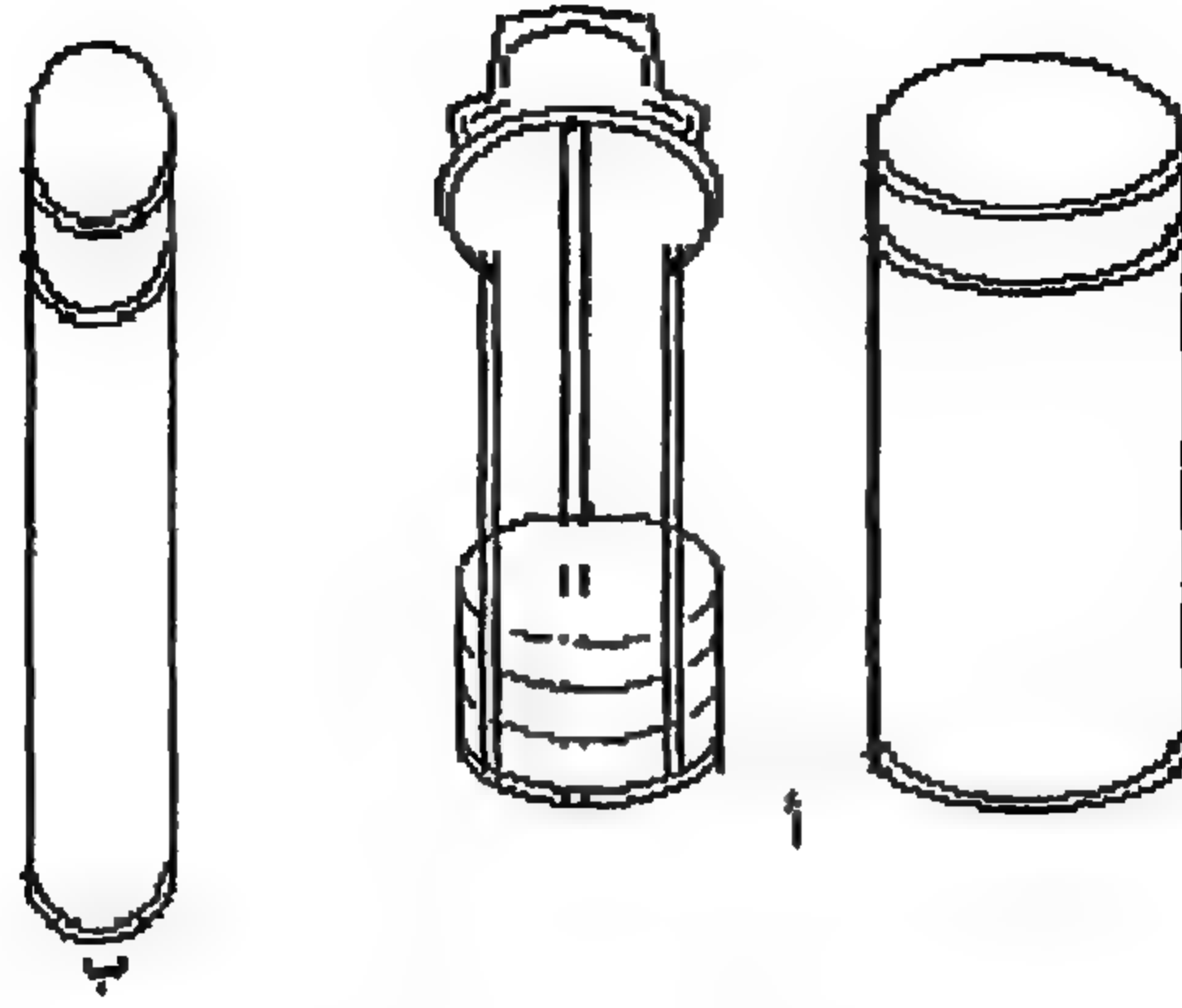


شكل ١٩: فرن الهواء الساخن (يعمل بالكهرباء) ويستعمل في أغراض التعقيم الحراري الجاف .

وعندما نتبع هذه الطريقة لتعقيم الأدوات الزجاجية يراعى أن توضع الماصات وأطباق بترى فى أوعية معدنية أو نحاسية خاصة ذات غطاء يحكم غلقه قبل تعقيمها (شكل ٢٠)، وتتلخص خطوات التعقيم بهذه الطريقة بأن توضع الأدوات الزجاجية أو العلب المعدنية المحتوية عليها بالفرن وهو على درجة حرارة الغرفة ثم يحكم قفله، وترفع درجة حرارة الفرن إلى الدرجة المطلوبة، وهنا نبدأ فى حساب فترة التعقيم، وبإنتهاء الفترة المطلوبة يوقف التسخين ويترك الفرن ليبرد تدريجياً حتى درجة حرارة الغرفة تجنباً لكسر الأدوات الزجاجية أو تلوثها بالهواء الجوى الذى قد يندفع إليها إذا ما أخرجت من الفرن وهى لازالت ساخنة، ويفضل تغليف الفوهات باستعمال رقائق الألومنيوم.

٢- اللهب المباشر : Incineration heat

عادة يستخدم اللهب المباشر من مصباح بنزن فى تعقيم إبر التلقيح المستقيمة أو ذات العقدة، وذلك بتسخينها حتى درجة الإحمرار، وعادة تصنع مثل هذه الإبر من أسلاك رفيعة من البلاتين أو خليط من النيكل والكروم، وهذه المعادن عادة تسخن بسرعة وتفقد حرارتها بسرعة فعندما تسخن لدرجة الإحمرار يهلك كل ما يلوثها من الكائنات الحية الدقيقة، وبعد أن تترك لتبرد لفترة ثوان قليلة تستعمل فى تلقيح البيئات المعقمة للحصول على المزارع النقية، ويجب أن نتخذ الحيلة أثناء عملية تسخين هذه الإبر حتى لا تنتثر الأجزاء التى تكون عالقة عليها قبل أن تهلك محتوياتها من الكائنات الدقيقة، فقد تحمل القطرات الصغيرة المتناثرة بعض خلايا البكتيريا التى لازالت حية، ويمكن تلافى ذلك بتجفيف الإبر أولاً خارج منطقة اللهب وذلك بتقريبها منه لفترة بسيطة قبل وضعها فى اللهب المباشر.



شكل ٢٠: أ- رسم تخطيطي لعربة معدنية توضع بها أطباق بترى وأخرى للماصات
تهيئة لتعقيمها في فرن الهواء الساخن. لاحظ الحامل الداخلي الذي ترص به الأطباق .
ب - عربة معدنية توضع بها الماصات قبل التعقيم في فرن الهواء الساخن .

٣- التلهيب الكحولي: Alcohol flaming

يمكن تعقيم بعض الأدوات كالمشرط أو الملقط أو المقص وذلك بغمر
الجسم المراد تعقيمه في كحول إيثايل ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل مايلق به
من كحول ويعمل على قتل الكائنات الحية الدقيقة التي تكون عالقة به .
وبتكرار هذه العملية أكثر من مرة تزداد كفاءة هذه الطريقة في التعقيم .
وتتميز هذه الطريقة بسرعتها إلا أنه يجب استعمال الأدوات التي تعقم عن هذا
الطريق مباشرة بعد تعقيمها .

(ب) التعقيم بالحرارة الرطبة : Moist heat

يقصد بالتعقيم عن طريق الحرارة الرطبة إستغلال بخار الماء في
إجراء التعقيم بدلاً من الهواء الساخن . وقد يستغل بخار الماء مباشرة أو أن
يضغط إلى درجة تصل إلى ضعف الضغط الجوي العادي حيث تزداد درجة
حرارة البخار تحت الضغط المرتفع .

وعادة تكون الحرارة الرطبة أكثر كفاءة في قتل الخلايا الحية من الحرارة الجافة وذلك لأنها أكثر قدرة على التغلغل داخل الخلايا، كما أنها ذات قدرة أسرع على تجميع وتخثير Coagulation البروتين الخلوى . فالحرارة الرطبة تفسد الطبيعة الغروية التي تميز البرتوبلازم الحى، والتي تعتمد عليها حياة الخلية . وهذا يعنى أن زيادة المحتوى المائى للبروتين يؤدي إلى تخثره على درجات حرارة أقل مما لو كان البروتين جافاً وجدول ٢ يبين هذه الظاهرة في حالة ألبومين البيض .

جدول (٢) : تأثير المحتوى المائى لألبومين البيض على تجمعه أو تخثره بواسطة الحرارة المرتفعة .

النسبة المئوية للماء الموجود	درجة التجمع والتخثر Coagulation Point (م)
٥٠	٥٦
٢٥	٧٨-٧٤
١٨	٩٠-٨٠
٦	١٤٥
صفر	١٧٠-١٦٠

وفيما يلى وصف لطرق التعقيم بالحرارة الرطبة والأجهزة المستعملة

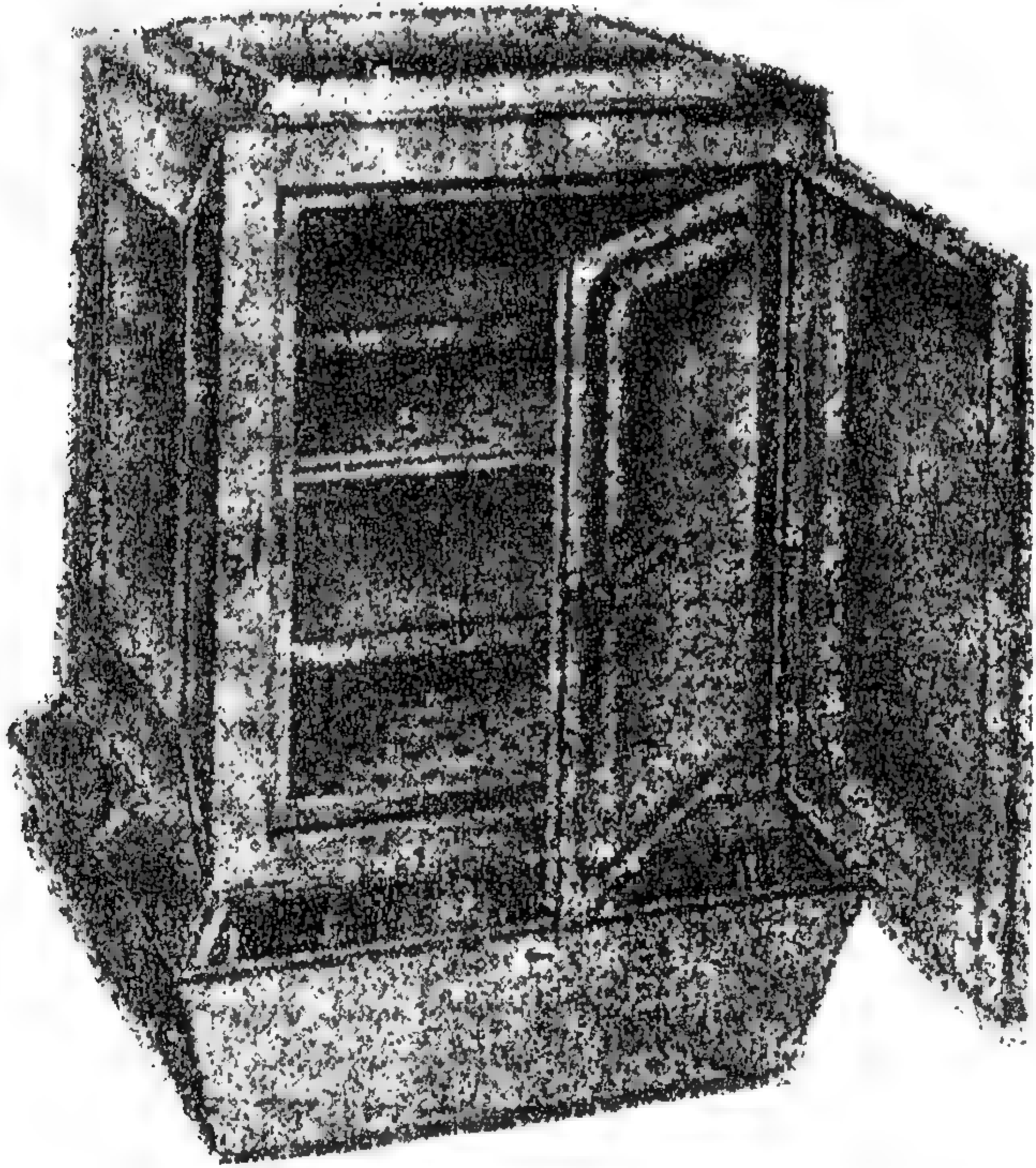
فيها:

١- معقم أرنولد: Arnold sterilizer

عبارة عن وعاء معدنى (شكل فرن الهواء الساخن) مبطن بطبقة عازلة للحرارة ذو أرفف مثقوبة لتسهيل تسرب البخار إلى كل أجزاء الجهاز وله فتحة في قمته يوضع بها ترمومتر لقياس درجة الحرارة بداخل الجهاز أثناء التعقيم

(شكل ٢١) • ويجب التأكد قبل تشغيل الجهاز من إحتوائه على الماء إلى الإرتفاع المناسب فى الخزان الخاص بذلك • وتوضع المواد المراد تعقيمها على الأرفف ويقفل الغطاء وترفع حرارة الخزان ليغلى الماء به تحت الضغط الجوى العادى، ويحسب الوقت اللازم للتعقيم عندما تصل حرارة الجهاز الداخلية إلى درجة ١٠٠م°.

ويوجد بالأسواق معقمات بخارية أخرى أكثر تطوراً قد توصل إلى مصدر دائم للبخار بدلاً من توليد البخار فى الجهاز نفسه •



(شكل ٢١) معقم أرنولد

ويتم التعقيم فى هذا النوع من الأجهزة على ثلاث فترات فى ثلاثة أيام متتالية، ويعرف التعقيم فى هذه الحالة بالتعقيم المتقطع Fractional sterilization أو Tyndallization . وفى اليوم الأول تعرض المواد المراد تعقيمها إلى البخار (١٠٠م) لمدة تتراوح بين ١/٢ - ١ ساعة حسب طبيعة وحجم المادة المراد تعقيمها ثم تترك لتبرد، وتوضع بالحضان على درجة ٣٠م أو تترك على درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٤ ساعة . وفى اليوم الثانى والثالث تكرر العمليات السابقة، ثم تحفظ البيئات التى تعقم عن هذا الطريق فى يومها الثالث بالحضان على درجة ٣٠م للتأكد من كفاءة التعقيم، ويمكن التعرف على ذلك بعدم ظهور نموات بكتيرية بالبيئة المعقمة .

والفكرة الأساسية فى التعقيم المتقطع هو أن الخلايا البكتيرية الخضرية وكذلك بعض الجراثيم الداخلية النابتة تهلك عندما تعرض لبخار الماء (١٠٠م) لمدة ثلاثون دقيقة . أما الجراثيم الداخلية الناضجة وغير النابتة فإنها تقاوم هذه الحرارة حتى ولو تعرضت إليها لمدة طويلة تصل إلى عدة ساعات، كذلك فإن ترك البيئة بالحضان أو بالغرفة لمدة ٢٤ ساعة يسمح لهذه الجراثيم المقاومة للحرارة بأن تنبت وتتحول إلى خلايا خضرية تهلك خلال فترة التعقيم فى اليوم التالى .

وزيادة فى الاحتياط يعطى ما يتبقى من جراثيم فرصة أخرى للإنبات قبل إجراء فترة التعقيم الثالثة وبذلك نضمن إتمام عملية التعقيم . ويجب أن نلاحظ أنه إذا لم تنبت كل الجراثيم بالبيئة قبل إجراء التعقيم فإنه لا يمكن الاعتماد على هذه الطريقة كوسيلة للتعقيم، حيث أن حرارة البخار تحت الضغط الجوى العادى (١٠٠م) تفشل فى قتل الجراثيم غير النابتة والمقاومة للحرارة، وقد يرجع السبب فى عدم إنبات الجراثيم أثناء إجراء التعقيم بهذه الطريقة إلى ما يأتى:

١- قد تكون البيئة الغذائية المراد تعقيمها غير مناسبة لإنبات الجراثيم فالماء المقطر ومحاليل بعض الأملاح المعدنية لا تعتبر وسطاً مناسباً لإنبات بعض الجراثيم.

٢- جراثيم البكتيريا غير الهوائية لن تثبت طالما كانت البيئة معرضة إلى ظروف هوائية.

وتتبع طريقة التعقيم المتقطع هذه عادة في تعقيم البيئات التي يدخل فيها الجيلاتين واللبن والسكريات التي يخشى من تحللها إذا ما أستعملت طريقة التعقيم بالبخار تحت ضغط مرتفع حيث تزيد درجة الحرارة في الحالة الأخيرة عن ١٠٠ م°.

٢- الأوتوكلاف: Autoclave

يستغل بخار الماء أيضاً في جهاز الأوتوكلاف إلا أن زيادة الضغط بداخل الجهاز تزيد من درجة حرارة التعقيم. فمن المعروف أن الماء يغلي على درجة حرارة ١٠٠ م° تحت الضغط الجوي العادي أما إذا زاد الضغط فوق الماء عن الضغط الجوي فإنه يغلي على درجات أكثر ارتفاعاً. وجدول ٣ يبين العلاقة بين ضغط البخار ودرجة الحرارة التي يصل إليها.

جهاز الأوتوكلاف (شكل ٢٢) في أبسط صورة عبارة عن أسطوانة معدنية عادة تصنع من الصلب أو من سبائك معدنية قوية تتحمل ضغط قد يصل إلى ٣٠ رطل/ بوصة مربعة على الأقل، له غطاء يقفل بإحكام بعد أن يوضع به المواد المراد تعقيمها، وبعد التأكد من إحتواء الجهاز على الماء إلى الإرتفاع المناسب مع ترك صنبور البخار (أ) مفتوحاً تشعل مصابيح بنزن (إذا كان الجهاز يعمل بالغاز) أو يوصل التيار الكهربائي (إذا كان تسخينه يتم بالكهرباء)، أو يدفع به بخار الماء (من مصدر دائم للبخار)، وعندما يشاهد البخار خارجاً بشدة من

الصنبور (أ) فإن هذا يعنى خلو الجهاز من الهواء وإملائه بالبخر • عندئذ يقفل الصنبور (أ) جيداً ويترك البخر ينضغط بداخل الجهاز حتى يصل إلى الضغط المطلوب وهو ١٥ رطل /بوصة مربعة ويعرف ذلك بالإستعانة بالمانوميتر المتصل بالجهاز • ويمكن تنظيم الضغط بداخل الجهاز بتعديل طول ذراع رافعة تتحكم فى قفل وفتح صمام الأمن • وهناك طرقاً أخرى لتنظيم الضغط فى الأجهزة الأكثر تطوراً • وتحت هذا الضغط (١٥ رطل /بوصة مربعة) تصل درجة حرارة البخر إلى ١٢١,٦ م° وعندما يصل الضغط والحرارة إلى هذه الدرجة يحسب وقت التعقيم الذى يختلف باختلاف طبيعة وحجم المواد المراد تعقيمها والجدول ٤ يبين الوقت اللازم لتعقيم أحجام مختلفة من محاليل مائية أو سوائل معبأة فى أوعية مختلفة الحجم •

جدول (٣) العلاقة بين زيادة ضغط البخر ودرجة حرارته

درجة الحرارة م°	ضغط البخر رطل/بوصة مربعة
١٠٠	صفر
١٠٧,٧	٥
١١٥,٥	١٠
١٢١,٦	١٥
١٢٦,٦	٢٠
١٣٠,٥	٢٥
١٣٤,٤	٣٠

بعد إنتهاء مدة التعقيم يوقف مصدر الحرارة فينخفض تدريجياً كل من درجة الحرارة والضغط بداخل الجهاز .

ويراعى عدم الإسراع فى خفض الضغط بداخل الجهاز فجأة وذلك بفتح الصنبور (أ) حيث أن السوائل تكون عندئذ على درجة أعلى من ١٠٠م وأن تعرضها فجأة لضغط الجو العادى يؤدي إلى غليانها بشدة داخل الأوعية وإلى تطاير سداداتها بعيداً عنها، لذلك يجب أن نسمح بالإنخفاض التدريجى للضغط بداخل الجهاز حتى يصبح مساوياً للضغط الجوى ويمكن التأكد من ذلك بالإستعانة بالمانومتر . وبعدها يفتح الصنبور (أ) ثم يفتح غطاء الجهاز وترفع الأدوات المعقمة .

جدول (٤) : الوقت اللازم لتعريض محاليل مائية أو سوائل بداخل أوعية مختلفة الحجم ليتم تعقيمها فى جهاز الأوتوكلاف .

الوعاء	سعة الوعاء	وقت التعريض بالدقائق عند ١٢١-١٢٣م
أنابيب اختبار	١٥٠×١٨مم	١٤-١٢
أنابيب اختبار	٢٠٠×٣٢مم	١٧-١٣
أنابيب اختبار	٢٠٠×٣٨مم	٢٠-١٥
دوارق مخروطية (بيركس)	٥٠مل	١٤-١٢
دوارق مخروطية (بيركس)	٢٠٠مل	١٥-١٢
دوارق مخروطية (بيركس)	٥٠٠مل	٢٢-١٧
دوارق مخروطية (بيركس)	٢٠٠٠مل	٣٥-٣٠

وقد تقل كفاءة التعقيم بالأوتوكلاف إذا ما أهمل إخراج الهواء من داخل الجهاز قبل قفل الصنبور (أ) حيث أن وجود الهواء مختلطاً بالبخار بداخل الجهاز يقلل من درجة حرارة التعقيم فقد وجد أن درجة حرارة مخلوط من البخار والهواء عند ضغط معين تكون أقل بكثير من درجة حرارة البخار بمفرده عند نفس الضغط (جدول ٥) .

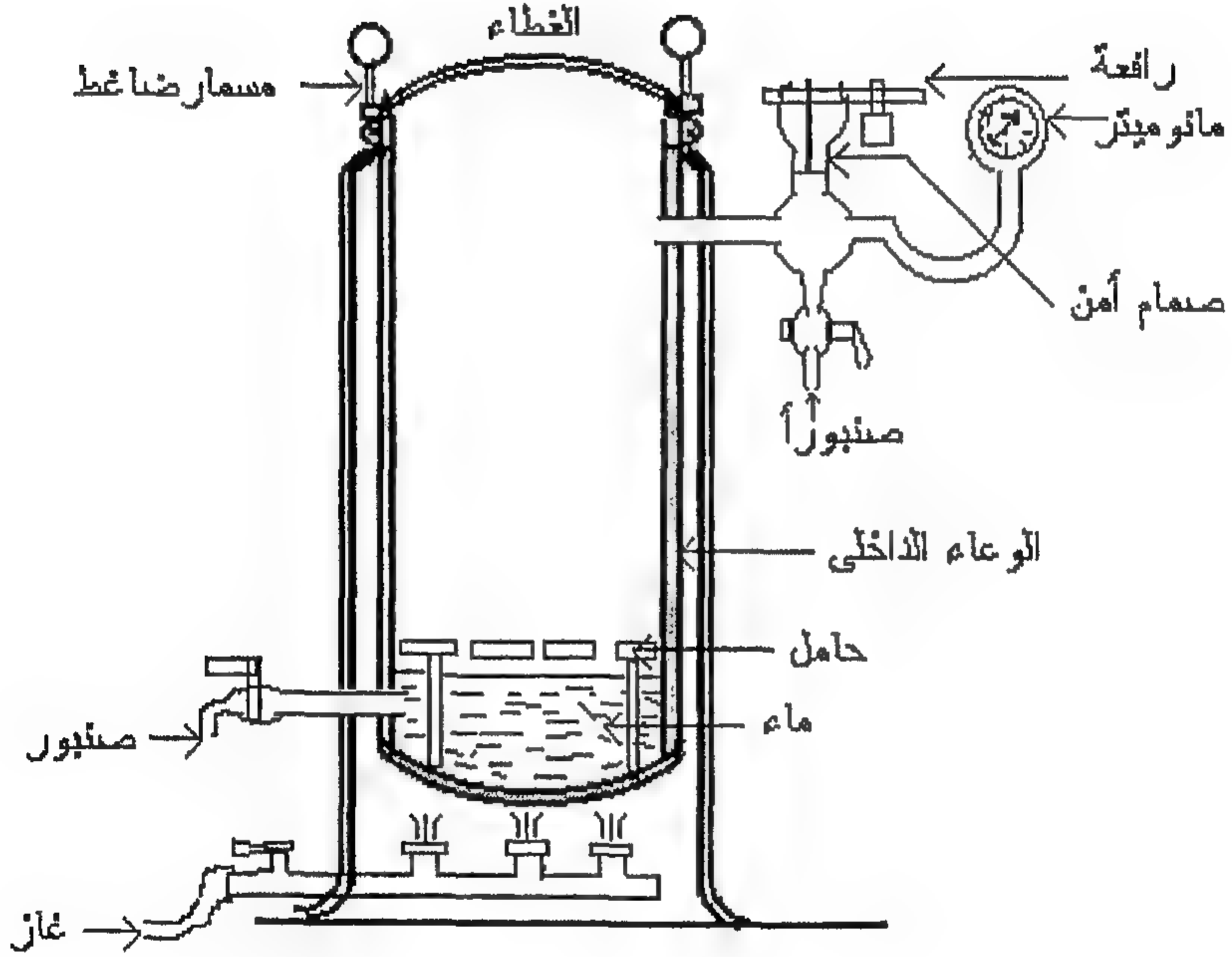
ولما كانت فاعلية الأوتوكلاف في التعقيم ترجع إلى الحرارة الرطبة للبخار تحت الضغط وليس إلى الضغط المرتفع بمفرده ، لذا فإننا نلمس أهمية ارتفاع الحرارة بداخل هذا الجهاز وأن أى عامل يقلل من الحرارة يعتبر مقللاً لكفاءة التعقيم .

كذلك يجب أن نراعى أهمية وصول البخار إلى المادة المراد تعقيمها فإذا لم يصل البخار إلى المادة فإن عملية التعقيم لا تخرج عن كونها عملية تعقيم حرارى جاف (١٢١م لمدة عشرون دقيقة) الأمر الذى لا يكفى للتعقيم حتى بالحرارة الجافة كما سبق أن بينا، ويحدث ذلك عادة إذا قفلت الأوعية بسدادات شديدة الإحكام أو قلت مسامية المواد المراد تعقيمها كالكميات الكبيرة من التربة فإن ذلك يعوق وصول البخار إلى داخلها ويشترط عدم إحكام غلق السدادات وأن تغطى الأوعية بسدادات مسامية من القطن أثناء تعقيمها .

ويستعمل الأوتوكلاف عادة فى تعقيم كثير من البيئات الغذائية السائلة أو المضاف إليها الآجار آجار ومحاليل السكريات الأحادية ومحاليل الأملاح المختلفة ، وكذلك يستعمل الأوتوكلاف فى قتل المزارع القديمة قبل التخلص منها ، وكذلك فى تعقيم الملابس والقفازات وأدوات الجراحة .

وهناك بعض المواد لا يمكن تعقيمها بالأوتوكلاف مثل المواد التى لا تمتزج بالماء مثل الدهون والزيوت وكذلك المواد التى تتأثر بالحرارة المرتفعة .

وفى بعض الأحيان يمكن إستعمال الأوتوكلاف كمعقم حرارى تحت الضغط الجوى العادى، وذلك إذا أستعمل مع ترك الصمام (أ) مفتوحاً. وتختلف سعة الأوتوكلافات تبعاً للحاجة إليها فهناك أوتوكلافات كبيرة الحجم تستعمل فى مصانع حفظ الأغذية حيث يشترط تعقيم المعلبات تعقيماً تاماً، وتستعمل آلات رفع كبيرة فى وضع وإخراج الكميات الكبيرة من المعلبات قبل وبعد تعقيمها بداخل الأوتوكلاف فى هذه المصانع.



شكل ٢٢ : قطاع طولى فى الأوتوكلاف.

جدول (٥): العلاقة بين درجة تفريغ الهواء ودرجة الحرارة داخل الأوتوكلاف عند ضغط بخار ١٥ رطل/بوصة مربعة .

تفريغ الهواء	ضغط البخار رطل/بوصة مربعة	درجة الحرارة داخل الأوتوكلاف °م
تام	١٥	١٢١
٣/٢	١٥	١١٥
٢/١	١٥	١١٢
٣/١	١٥	١٠٩
صفر	١٥	١٠٠

إختبار كفاءة التعقيم فى الأوتوكلاف:

تختبر الكفاءة التعقيمىة للأوتوكلاف بالتأكد من أن درجة الحرارة المبينة على الترمومتر وقيمة الضغط التى يبينها المانوميتر هى قيماً حقيقية للحرارة والضغط بداخل الجهاز، إذ أحياناً ما تختلف القراءات التى تظهرها هذه المقاييس عن الواقع بداخل الأوتوكلاف لعطل قد يصيبها وفى هذه الحالة لا يكون التعقيم سليماً ، ولمنع مثل هذه الأخطاء يلحق بالأوتوكلافات الكبيرة الحجم وخاصة تلك المستعملة فى مصانع الحفظ والمستشفيات ثيرموجراف يتصل ذراعه بالترموترات الداخلية للتأكد من انتظام الحرارة ولتسجيل ما قد يطرأ على درجة الحرارة من إختلاف أثناء فترة التعقيم، وأختبار كفاءة التعقيم تتم إما بطريقة حيويه أو طريقة كيمياوية .

التمرين الخامس عشر (أ)

أختبار كفاءة التعقيم بطريقة حيويه .

١- ضع كمية من القطن أو قصاصات من ورق الترشيح بعد تشبيعها

بمعلق من جراثيم البكتيرة وهما من البكتيرات المحبة للحرارة Thermophilic

والتي تتحمل جراثيمها درجات حرارة مرتفعة مثل *Bacillus stearothermophilus* أو *Bacillus subtilis* إن لم تتوفر البكتيريا الأولى في أظرف من الورق .

- ٢- ضع الأظرف في مكان مناسب بالأوتوكلاف أثناء التعقيم .
- ٣- بعد إنتهاء عملية التعقيم، يؤخذ جزء من القطن أو إحدى قصاصات ورق الترشيح ويغمر في بيئة زرع معقمة ومناسبة .
- ٤- يحضن المزارع على درجة ٥٥°م في حالة البكتيريا الأولى ، ٣٧°م في حالة البكتيريا الثانية لمدة ٢٤ ساعة .
- ٥- ظهور نمو واضح بالبيئة بعد فترة التحضين يدل على عدم كفاءة التعقيم، (من المعروف أن درجة الحرارة المهلكة لجراثيم هذه البكتيريا هي ١٢١°م عندما تعرض لها لمدة ١٢ دقيقة) .

التمرين الخامس عشر (ب)

أختبار كفاءة التعقيم بطريقة كيماوية

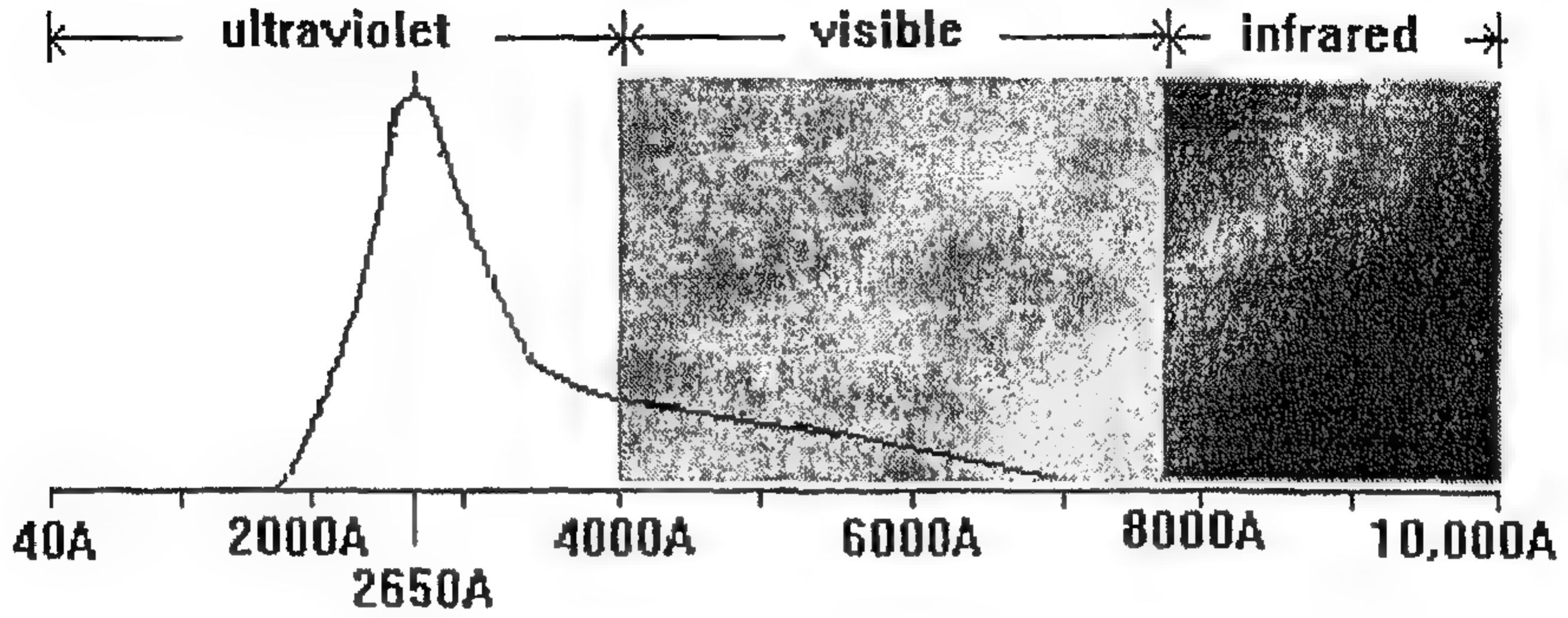
- ١- ضع كمية صغيرة من أحد المواد الكيماوية ذات درجة إنصهار تشابه درجة حرارة التعقيم في الأوتوكلاف (مثل الكبريت ودرجة إنصهاره ١١٥°م أو Succinic anhydride ودرجة إنصهاره ١٢٠°م) في أنابيب شعرية في الأوتوكلاف أثناء إجراء التعقيم .
- ٢- إذا إنصهرت هذه المواد دل ذلك على كفاءة التعقيم ووصول درجة الحرارة في الأوتوكلاف أثناء التعقيم إلى درجة لا تقل عن درجة إنصهار المادة المستعملة .
- ومن عيوب هذه الطريقة أنها لا تبين مدى إستمرار الحرارة المرتفعة داخل الأوتوكلاف فقد تهبط درجة حرارة الأوتوكلاف عقب إنصهار المادة .

ثانياً : الإشعاعات Radiations

يستفاد عملياً من التأثير الضار لبعض الإشعاعات على خلايا البكتيريا في تعقيم الأماكن كغرف العمليات الجراحية وعنابر تعبئة الأدوية والعقاقير المعقمة أو في غرف التلقيح الملحقة عادة بالمعامل البكتيريولوجية الكبيرة ، وفي بعض الصناعات الغذائية أو صناعات الألبان أو في تعقيم السطوح الكبيرة الملوثة في محطات الحجر الزراعي لتطهير المنتجات الزراعية مما يكون عالقاً بها من كائنات ممرضة يخشى إنتقالها من مكان إلى آخر، كما يمكن تعقيم أطباق بترى أو الماصات المصنوعة من البلاستيك بواسطة الأشعة فوق البنفسجية بعد تغليفها في أكياس من مادة البولي اثيلين وذلك خوفاً من استعمال الحرارة في تعقيمها، والشكل (٢٣) يبين المناطق الفعالة في المجال الضوئي في إبادة الكائنات الدقيقة .

١- الأشعة فوق البنفسجية: Ultraviolet radiation

عادة تستعمل هذه الأشعة أكثر من غيرها في أغراض التعقيم وفي الأغراض السابق ذكرها ويمكن الحصول عليها من صمامات خاصة يمكنها أن تشع تركيزات مرتفعة من هذه الأشعة والتي يتراوح طول موجاتها من ٢٦٠ إلى ٢٧٠ nm وهو النطاق الفعال في إبادة الأحياء الدقيقة . ويلاحظ أن للأشعة فوق البنفسجية قدرة ضعيفة على التغلغل داخل الأشياء، من ذلك نرى أن فعلها التعقيمي يكون غالباً سطحياً، كما أن طبقة رقيقة من الزجاج قد تحجز نسبة كبيرة منها لذلك يتجنب تعقيم المواد في الأوعية الزجاجية، وقد يعزى التأثير المميت للأشعة فوق البنفسجية إلى تكوين فوق أكاسيد Peroxides في الوسط المعامل وهذه تعمل كعامل مؤكسد ، أو نتيجة لتأثيرها على DNA الخلية .



شكل ٢٣: يبين المناطق الفعالة في المجال الضوئي في إبادة الكائنات الحية الدقيقة .

٢- الإشعاعات الأخرى:

يمكن إستعمال الأشعة السينية X-rays ذات الموجات القصيرة التي تعرف أيضاً باسم Roentengen rays، وكذلك أشعة جاما ذات الموجات التي يتراوح طولها بين ٠,٠٠٥ و ١ nm في أغراض التعقيم وهذه الإشعاعات لها قدرة عالية على إختراق الأجسام الصلبة والتغلغل فيها، ولأزال استعمال الأشعة السينية في هذا الصدد من الأمور غير العملية وذلك لتطلبها أجهزة خاصة ولزيادة تكاليفها .

ونظراً لما لأشعة جاما من القدرة العالية على الإختراق فيقتصر استعمالها في التعقيم الداخلي للأجسام الصلبة السمكية فقط .

الطرق الكيميائية المتبعة فى التعقيم

يمكن استعمال بعض المواد الكيماوية فى أغراض التعقيم وذلك لفعلها المميت أو الموقف لنمو خلايا الأحياء الدقيقة ، وفيما يلى بعض المواد الكيماوية التى تستعمل وهى فى صورة محاليل للتعقيم السطحى للمواد التى لا يمكن تعقيمها بالطرق الحرارية .

كحول الإيثيل Ethyl alcohol

يستعمل عادة كحول الإيثيل بتركيز يتراوح بين ٥٠-٧٠٪ فى تطهير الأيدي أو المناطق المختلفة فى جسم الإنسان ، والسبب الأساسى للتأثير السام للكحول هو أنه يعمل على تجفيف الخلايا Dehydration حيث يسحب الماء منها، علاوة على قدرته على تجميع وتخثير Coagulation البروتين الخلوى عندما ينفذ إلى داخل الخلايا، وكلا التأثيرين يؤديان إلى موت الخلية Bactericidal action . ويقال أن قلة الكفاءة التعقيمية للتركيزات الكحولية التى تزيد عن ٧٠٪ وكذلك الكحول المطلق ١٠٠٪ ، قد ترجع إلى زيادة فعلها التجفيفى على حساب القدرة التخثرية للكحول بمعنى أن كمية الماء المزالة من الخلايا تكون كبيرة بدرجة تعوق دخول الكحول إلى الخلايا، لذلك يكون تأثير التركيزات المرتفعة من الكحول تأثيراً مجففاً فقط وهذا يتسبب عنه إيقاف نمو الخلايا Bacteriostatic action .

ومما هو جدير بالذكر أنه ليس للكحول بجميع تركيزاته أى تأثير ضار على الجراثيم الداخلية .

الفينول أو حمض الكربوليك Phenol or Carbolic acid

يستعمل محلول هذه المادة بتركيزات تتراوح بين ٢-٥٪ للتعقيم السطحى لأرضيات الغرف والعيادات والمعامل وكذلك فى تعقيم أسطح المناضد التى تجرى عليها عمليات العزل والتنمية لمزارع الكائنات الدقيقة وبعض

الأدوات والأجهزة • وتقتل التركيزات المستعملة (٢-٥٪) من الفينول خلايا الكائنات الحية الدقيقة نتيجة لتجميعها وتخثيرها للبروتين الخلوى بمعنى أنها ذات تأثير مميت •

كلوريد الزئبقيك (Hg Cl₂) Mercuric chloride

يستعمل محلول كلوريد الزئبقيك والذى يطلق عليه أيضاً السليمانى بتركيز ١٪ فى أغراض التعقيم السطحى لكثير من الأشياء مثل تعقيم أسطح المناضد وغيرها كما يستعمل هذا المحلول فى التعقيم السطحى للأجزاء النباتية المصابة بأمراض نباتية توطئة لعزل الطفيل المسبب من أنسجة النبات الداخلية فى حالة نقية • ويرجع الفعل السام لهذا المحلول إلى إرتباط أيونات الزئبق بمجاميع السلفاهيدريل Sulfhydryl group (-SH) فى البروتين الإنزيمى فيتوقف نتيجة لذلك نشاط هذه الإنزيمات حيث أن نشاط كثير من الإنزيمات يعتمد على وجود هذه المجاميع بصورة حرة • أما إذا زاد تركيز كلوريد الزئبقيك فإن ذلك يؤدى إلى تجميع وتخثير البروتين الخلوى علاوة على إرتباطه بالمجاميع الفعالة السالفة الذكر •

أكسيد الإيثيلين Ethylene oxide

بعض المواد التى تستعمل فى تحضير بيئات الزرع تكون حساسة للتعقيم بالطرق الحرارية • فمثل هذه المواد يمكن أن تعقم بطريقة كيماوية • والمادة التى تستعمل فى التعقيم الكيمايى يجب أن تكون متطايرة Volatile وكذلك سامة للكائنات الحية الدقيقة • وبذلك يمكن إزالتها من المادة المراد تعقيمها بعد المعاملة وأهم مادة استعملت هى أكسيد الإيثيلين وهى مادة سائلة تغلى على درجة ١٠,٧°م يمكن أن تضاف إلى المحاليل فى صورة سائلة (التركيز النهائى يصل إلى ٥,١٪) على درجة حرارة من صفر - ٤°م • أو تستعمل فى صورة غازية على حرارة أعلى من درجة غليانها • وهى غير ثابتة كيماوياً فتتحلل فى المحاليل

المائية إلى جليكول الإيثيلين Ethylene glycol وهو غير متطاير وقد يكون له تأثيرات غير مرغوبة ويلاحظ أن أكسيد الإثيلين قابل للإنفجار وسام للإنسان ولذلك يجب أن تتبع احتياطات خاصة في استعماله . ولهذه الأسباب لا يستعمل كوسيلة روتينية في المعامل ولكن يستعمل في الصناعة في تعقيم أطباق بترى المصنوعة من البلاستيك أو أى مواد أخرى من البلاستيك كالسرنجاتوالتي قد تنصهر على درجات حرارة أعلى من ١٠٠م°.

الطرق الميكانيكية المتبعة في التعقيم

تعتمد هذه الطرق على إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كالترشيح حيث تحجز الثقوب الدقيقة للمرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الأقطار التي تزيد عن أقطار ثقبها .

الترشيح Filtration

يستعمل لذلك مرشحات بكتيرية يتراوح قطر ثقبها بين أقل من ميكرون واحد إلى عدة ميكرونات . ويراعى أن التعقيم بالترشيح لا يتوقف فقط على قطر الثقوب، بل يتوقف أيضاً على الشحن الكهربائية للمرشح وكذلك الشحنة الكهربائية للكائنات الدقيقة المحتوى عليها السائل، وكذلك على طبيعة ذلك السائل المراد ترشيحه . وعادة يسحب السائل خلال المرشح بإحداث ضغط سالب (تفريغ) على الجانب الآخر من المرشح حيث تستخدم مضخة تفريغ مائية أو كهربائية . وقد يستعمل في بعض الحالات ضغط موجب وذلك بالضغط فوق سطح السائل نفسه لدفعه خلال ثقوب المرشح وهناك عديد من المرشحات تختلف في نوع المادة التي تمنع منها المرشح وهي كما يلي:

١- مرشح شمبرلاند: Chamberland filter وهو مصنوع من نوع

معين من الخزف أو الصيني .

٢- مرشح بيركفيلد: Berkefeld filter وهو مصنوع من الطين

الدياتومي Diatomaceous earth.

٣- مرشح عجينة باريس: Plaster of paris filter وهو مصنوع من

عجينة باريس وهو من الجبس يتكون من كبريتات كالسيوم مع كربونات كالسيوم وأكسيد ماغنيسيوم.

٤- مرشح زائتس: Seitz filter والمرشح عبارة عن أقراص مختلفة

الحجم من مادة الأسبستس.

٥- مرشح الزجاج المسامي: Sintered glass filter والمرشح مصنوع

من الزجاج المسامي.

٦- المرشحات الغشائية أو الجزيئية: Membrane filter or

molecular filter ومن أمثلتها ما يعرف Millipore filters والذي يتكون من أغشية رقيقة مصنوعة من أسترات السليلوز.

وعادة تستعمل طريقة الترشيح في تعقيم محاليل كثير من المواد

الكيمائية التي لا يمكن تعقيمها عن طريق الحرارة الرطبة بنوعيتها ، حيث أن الحرارة المرتفعة تغير من الخواص الكيميائية والفيزيائية لهذه المواد ومن أمثلة ذلك التحضيرات الإنزيمية أو محاليل المضادات الحيوية أو السموم التي تفرز في المزارع أثناء نمو بعض البكتيريات لذلك فإن مثل هذه المواد تعقم بالترشيح بدلاً من الحرارة المرتفعة .

ولما كانت حبيبات الفيروس يمكنها أن تمر خلال ثقوب هذه المرشحات

لذلك فهي تستخدم في عزل الفيروسات أو البكتيريوفاجات عن الخلايا البكتيرية أو عن بقايا تحللها .

والمرشحات الخزفية أو الدياتومية أو الزجاجية أو المصنوعة من

أقراص الأسبستس، أو التي تتكون من سليكات معدنية، تحمل شحنات كهربائية

سالبة . فمثلاً عندما ترشح حبيبات تحمل شحنات موجبة خلال هذه المرشحات فإنها تجذب إلى أيونات السليكا ذات الشحنة المضادة وتبقى مثبتة ومدمصة على المرشح، وهذا ما يحدث كثيراً عند ترشيح الفيروسات والبكتيريوفاجات خلال مرشح زايٲس ذو الأقراص الأسبستية أيضاً . ولكن يلاحظ أنه إذا زاد تركيز الحبيبات أو جزيئات الفيروس في المحلول بدرجة تفوق ما يلزم منها للتفاعل مع أيونات السليكات أو الأسبستس فإنه يمكن للكمية الزائدة أن تمر خلال ثقوب المرشح . كما يلاحظ أيضاً أن التجانب أو الإدمصاص بين جزيئات المادة المرشحة وأيونات السليكا يكون تجاذباً مؤقتاً يمكن الرجوع فيه حيث أن إمرار الماء خلال مثل هذا المرشح يؤدي إلى انفصال الجزيئات المدمصة ومرورها خلال الثقوب . أما المرشحات المصنعة من عجينة باريك فإنها على العكس تحمل شحنات موجبة فهي بذلك لا تعوق ترشيح الجزيئات ذات الشحنات الموجبة . ومن ذلك يتضح أنه يمكننا أن ننتقى المرشح المناسب حسب طبيعة الشحنات التي تحملها جزيئات المادة المراد ترشيحها ، وسوف نتناول فيما يلي وصفاً مختصراً لبعض المرشحات الشائعة الإستعمال .

١- مرشح زايٲس Seitz filter

يعتمد هذا المرشح على أقراص من خليط من الأسبستس * والسليولوز ذات أقطار مختلفة وسمك يتراوح بين ٢-٣ مم يوضع بين شطري الجهاز (شكل

* وأقراص الأسبستس يمكن الحصول عليها من عدد من الشركات والبعض

منها ينتج للإستعمال تحت ظروف معينة فمثلاً الأقراص التي تنتجها شركة Ford's

Sterimatus لها درجات مختلفة يميزها الرموز التالية: GS= General sterilizing

GS/pH= Liquids sensitive to alkalinity

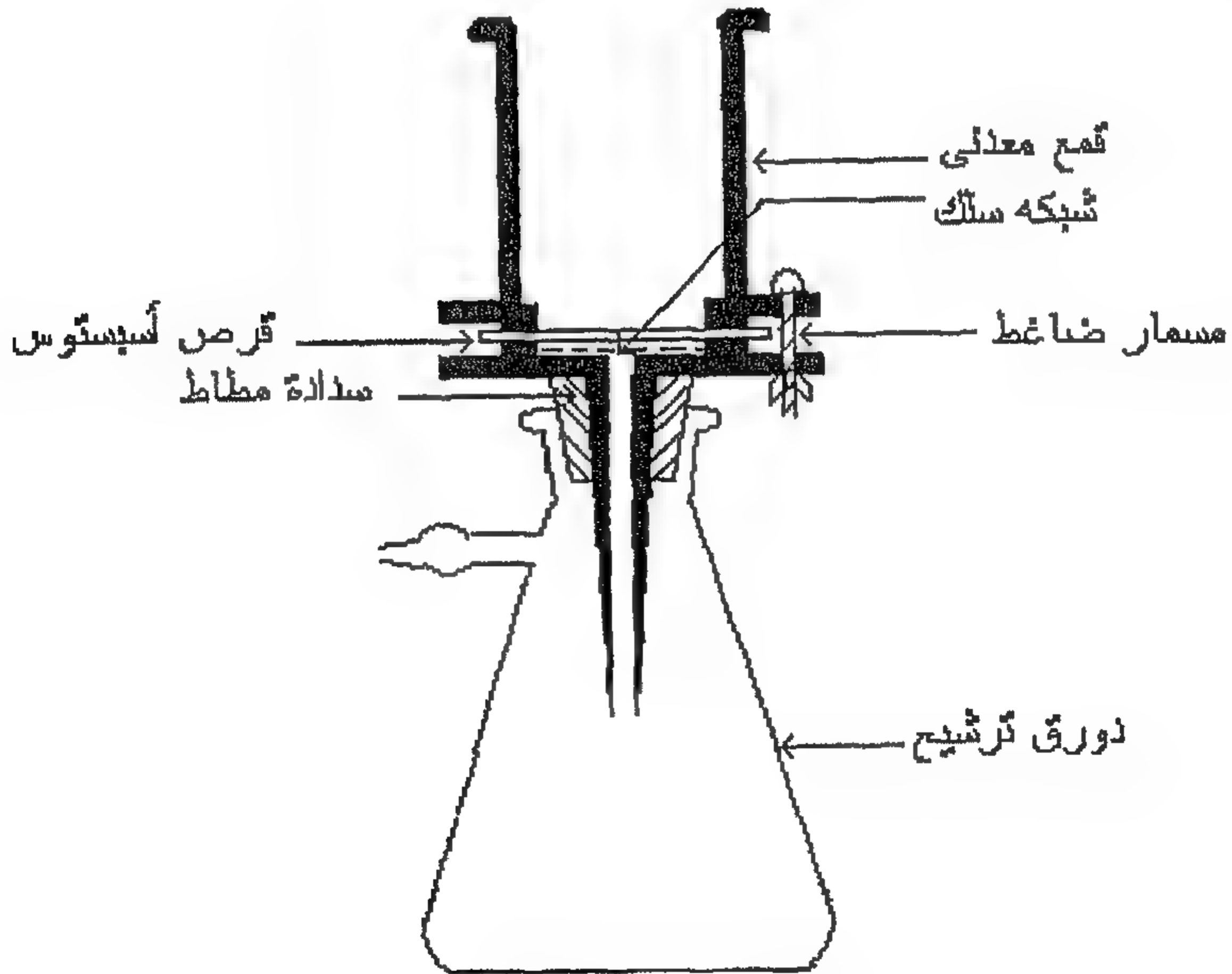
SB= Sterilizing liquids containing smallest micro-organisms

أما تلك التي تنتجها شركة John Carson فهي من نوع واحد وتستخدم تحت

مختلف الظروف • EKS-for general sterile filtration

٢٤ أ) والذي يشبه القمع إلى حد ما وتثبت بواسطة مسامير بريمية ضاغطة، وقمة الجهاز عبارة عن قمع صغير يوضع به المحلول المراد ترشيحه . وعادة يثبت الجهاز فى قمة دورق مخروطى خاص بالتفريغ يوصل إلى مضخة التفريغ ليساعد عملية الترشيح، ويراعى ضرورة تعقيم الجهاز قبل إستعماله وذلك بوضعه كاملاً فى الأوتوكلاف بعد تغليفه بالورق وتغطية الفتحة الجانبية للدورق بسدادة من القطن لمنع تكثيف البخار بداخله وكذلك لمنع التلوث بعد التعقيم . ويراعى أن يترك الجهاز بعد تعقيمه ليبرد ثم يستعمل الترشيح ويجمع المحلول المعقم (الراشح) فى الدورق المخروطى ويمكن بعد ذلك نقله بواسطة ماصة معقمة إلى أوعية أخرى معقمة .

ويلاحظ ضرورة إستعمال قرص جديد من الأسبستس عند كل عملية ترشيح مع مراعاة تعقيم الجهاز فى كل مرة .



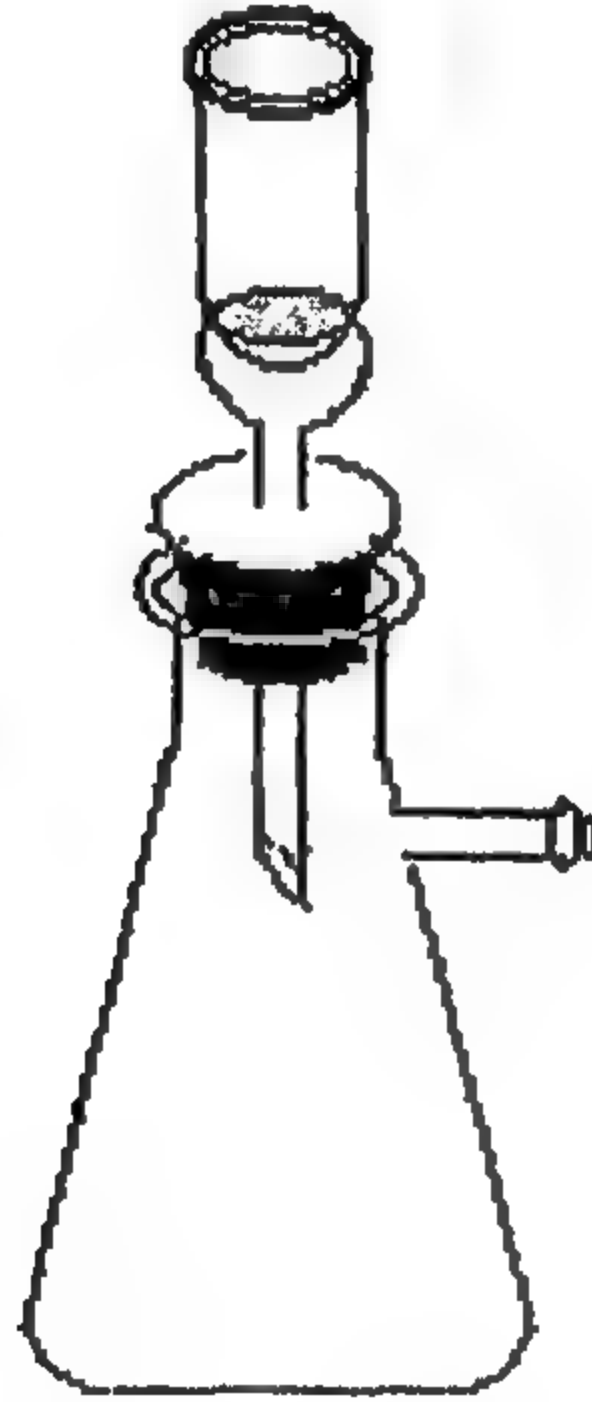
شكل ٢٤ أ : قطاع طولى فى مرشح زايٲس .

٢- مرشحات الزجاج ذات المسام الدقيقة

Sintered glass filters or Fritted glass filters

تعتمد هذه المرشحات على طبقة من الزجاج المسامي يثبت في أقماع زجاجية والطبقة المسامية المستخدمة تجهز من مسحوق ناعم من زجاج معين يسخن إلى درجة عالية من الحرارة لاتسمح بإنصهار الزجاج ولكن تسمح بتماسك المسحوق وتحوله إلى طبقة متصلة، بمعنى أن تتحد حبيبات المسحوق دون أن ينصهر الزجاج وبذلك تترك الحبيبات بينها مساماً دقيقة يمكن إستعمالها في الترشيح. (شكل ٢٤ ب) ويراعى عند الاستعمال أن يثبت القمع عن طريق سدادة مطاط فوق ورق ترشيح مخروطي من زجاج سميك له فتحة جانبية لتوصلها إلى مضخة التفريغ.

وهناك خمس درجات من هذه المرشحات تبعاً لقطر ثقبها ويشار لكل منها برقم خاص لتمييزه عن الأنواع الأخرى والنوع رقم ٥ (Grade 5) ذو مسام أضيق قطراً من الأنواع الأخرى لذلك فهي تستعمل كثيراً في الأغراض البكتريولوجية.



شكل ٢٤ ب : مرشح الزجاج المسامي.

وعادة تنظف هذه المرشحات بمعاملتها بحمض الكبريتيك المركز المضاف إليه نترات الصوديوم حيث أن هذا الحامض القوي يؤكسدويذيب المواد

العضوية التي تكون عالقة على سطح أو داخل مسام المرشح والتي يمكن بعدئذ التخلص منها ومن آثار الحمض بالغسيل بالماء الجارى.

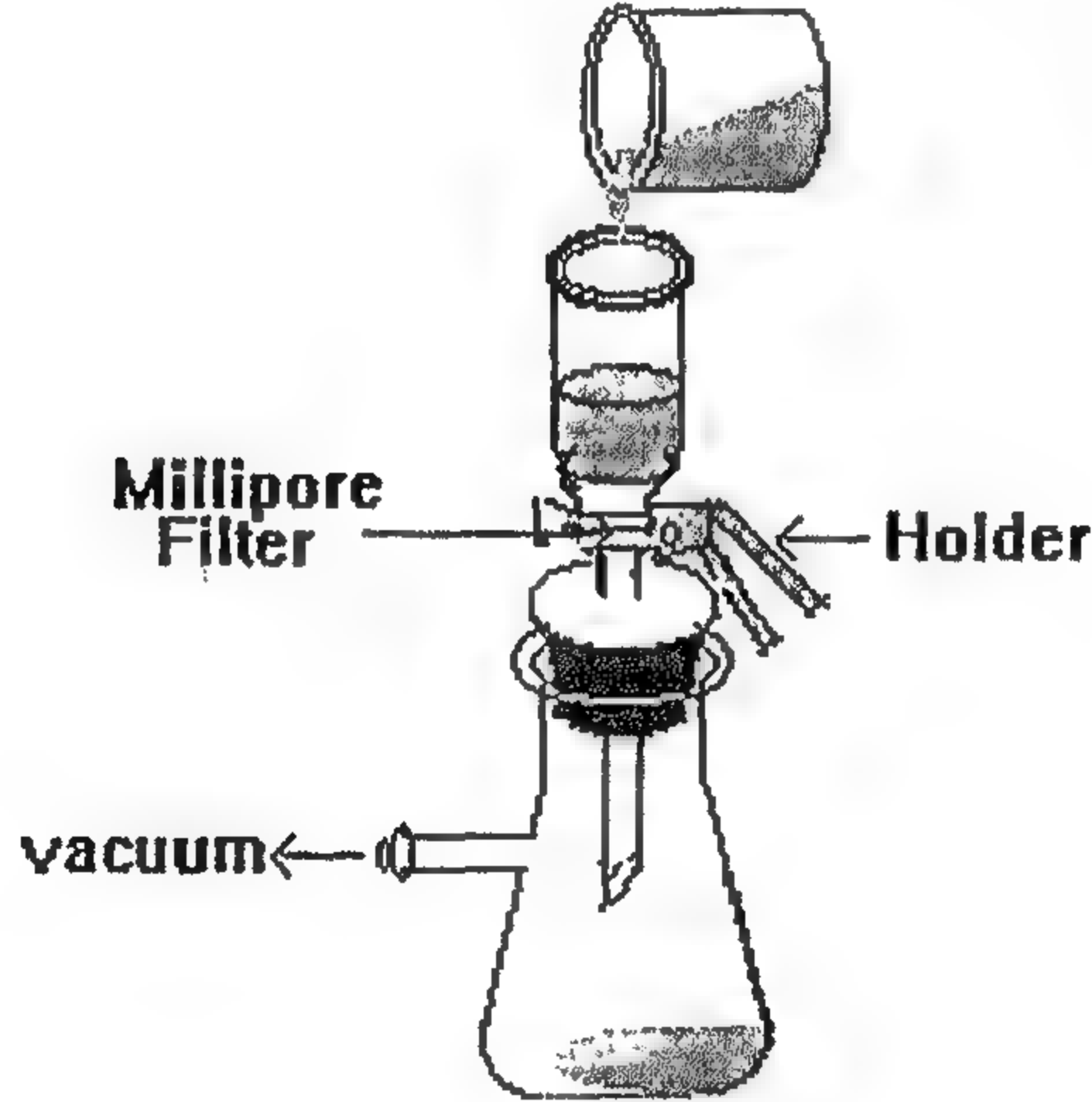
٣. المرشحات الغشائية أو المرشحات الجزيئية

Membrane or Molecular filter

عادة تفوق هذه المرشحات غيرها وذلك لسهولة إستعمالها والتخلص من الأغشية المستعملة فى الترشيح بعد إتمامه فلا يحتاج الجهاز لعمليات غسيل متكررة، كما توجد من الأغشية درجات مختلفة من المسامية يمكن إستعمالها وتتميز أيضاً بعدم إدمصاص المواد المراد ترشيحها على جزيئات المرشح. ومن أشهر هذه المرشحات وأكثرها إستعمالاً المرشحات التى تعرف بالمليپور Millipore filters. والمرشح أى الغشاء المستعمل فى الترشيح عبارة عن غشاء رقيق مسامى مصنوع من مادة نقية خاملة من الناحية البيولوجية هى أسترات السليلوز Cellulose esters أو بعض المواد المشابهة لها.

ويوجد من هذه الأغشية أنواع مختلفة تصل إلى ٢٠ نوع تختلف تبعاً لسعة ثقوبها التى تتراوح بين ٠.١-٤ ميكرون. ويتراوح قطر القرص المستعمل من ١٣ مم - ٢٩٣ مم. وعادة تتماثل أقطار الثقوب الخاصة بالقرص والمجموعة MF type يوجد منها ١٢ نوع مختلف يتراوح قطر ثقوبها بين ٠.١ - ٨ ميكرون ويصل سمك القرص إلى ١٣٥ ± ١٠ ميكرون ومنها النوع GS type الذى يستعمل كثيراً فى أغراض التعقيم والدراسات البكتيريولوجية ومتوسط قطر ثقوبه ٢٢، ± ٠.٢ ميكرون وله معامل إنكسار يصل إلى ١.٥١ (يشبه معامل إنكسار الزجاج أو زيت السيدر) ويمكن تعقيمه بالأوتوكلاف بحيث لاتزيد الحرارة عن ١٢٥°م. وعادة توضع الأغشية أو الأقراص فى جهاز خاص Millipore filter holder (شكل ٢٥) ويراعى تثبيته أيضاً فى ورق مخروطى زجاجى يوصل إلى مضخة التفريغ. وللغشاء إستعمالات أخرى ميكروسكوبية علاوة على إستعماله

فى التقدير الكمى للبكتيريات فى الماء أو فى بعض المواد الأخرى فبعد القيام بالترشيح يؤخذ الغشاء ويعامل بزيت السيدر Cedar wood oil حيث تمتلىء ثقبه بالزيت ويصبح شفافاً وبذلك يمكن فحص الحبيبات التى تكون عالقة على سطحه ميكروسكوبياً بإستعمال العدسة الزيتية . وفى حالة التقدير الكمى للبكتيريات بالماء مثلاً يرشح حجم معين من الماء المراد فحصه خلال الغشاء فتسكن محتوياته من الخلايا البكتيرية على سطح الغشاء . ينزع الغشاء بعدئذ ويوضع على سطح ورقة ترشيح مشبعة ببيئة غذائية مناسبة فى طبق بترى معقم، يوضع بالحضان لفترة ٢٤ ساعة تظهر بعدها مستعمرات البكتيريات فوق المرشح حيث يمكن بعد ذلك تقدير عددها كمياً .



شكل ٢٥ : Millipore filter أ - قمع زجاجى ب - قاعدة زجاجية
ج - قرص زجاجى مسامى يستند عليه المرشح الغشائى د - ماسك زنبركى

إختبار كفاءة طرق التعقيم المختلفة

التمرين السادس عشر

- ١- استعمل جهاز الأوتوكلاف فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى (١٥ رطل/بوصة^٢ لمدة ١٥ دقيقة) .
 - ٢- استعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠م لمدة ساعة) .
 - ٣- استعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠م لمدة ساعة) مرتين فى يومين متتاليين .
 - ٤- استعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠م لمدة ساعة) ثلاث مرات فى ثلاثة أيام متوالية .
 - ٥- رشح كمية من المرق المغذى باستعمال مرشح زائتس ثم انقل البيئة المرشحة إلى أنابيب ذات سدادات قطنية سبق تعقيمها وهى فارغة فى جهاز الأوتوكلاف .
 - ٦- ضع الأنابيب جميعاً بالحضان على درجة ٣٠م لمدة ٤٨ ساعة ثم إفحصها .
- (تعكير البيئة يدل على عدم كفاءة طريقة التعقيم المستعملة) .

طرق دراسة المزارع النقية

Pure culture techniques

عندما ندرس البكتيرات فى بيئاتها الطبيعية نثبت أنها تعيش فى مجاميع مختلطة، وفيما ندر ما توجد البكتيرات فى الطبيعة على صورة نقيه ذات نوع واحد فقط، ولكى يمكن للدارس أن يتعرف على الخواص المورفولوجية المزرعية لنوع بكتيرى معين فمن الضرورى أولاً أن يفصل هذا النوع عن غيره من الأنواع أو غيره من الكائنات المتواجدة فى بيئته الطبيعية أو بمعنى آخر يجب الحصول على هذا النوع فى مزرعة نقيه Pure culture .

توجد طريقتين رئيسيتين يمكن بواسطتهما الحصول على مزرعة نقيه من أخرى مختلطة ، وهما كما يلى : أولاً - طريقة تلقيح البيئات الصلبة بالأطباق تخطيطياً Streak plate method أو تعرف أيضاً باسم Loop dilution method . ثانياً - طريقة صب البيئات الصلبة بعد تلقيحها بكميات ضئيلة من المزرعة المختلطة فى الأطباق وتعرف Pour plate method وكلا الطريقتين تعتمد على تخفيف تركيز الكائنات بدرجة يمكن معها تمييز مستعمرات مفردة من النوع الواحد من البكتيرات .

وفى هذا التمرين سوف يقوم الدارس بفصل مكونات مخلوط من ثلاثة أنواع مميزة عن بعضها فى مزارع نقيه من مزرعة سائلة بإتباع الطريقتين سالفتى الذكر وهذه الكائنات : *Serratia marcesens* (حمراء) ، *Micrococcus leutus* (صفراء) ، *Escherichia coli* (بيضاء) .

أولاً : طريقة تخطيط الأطباق

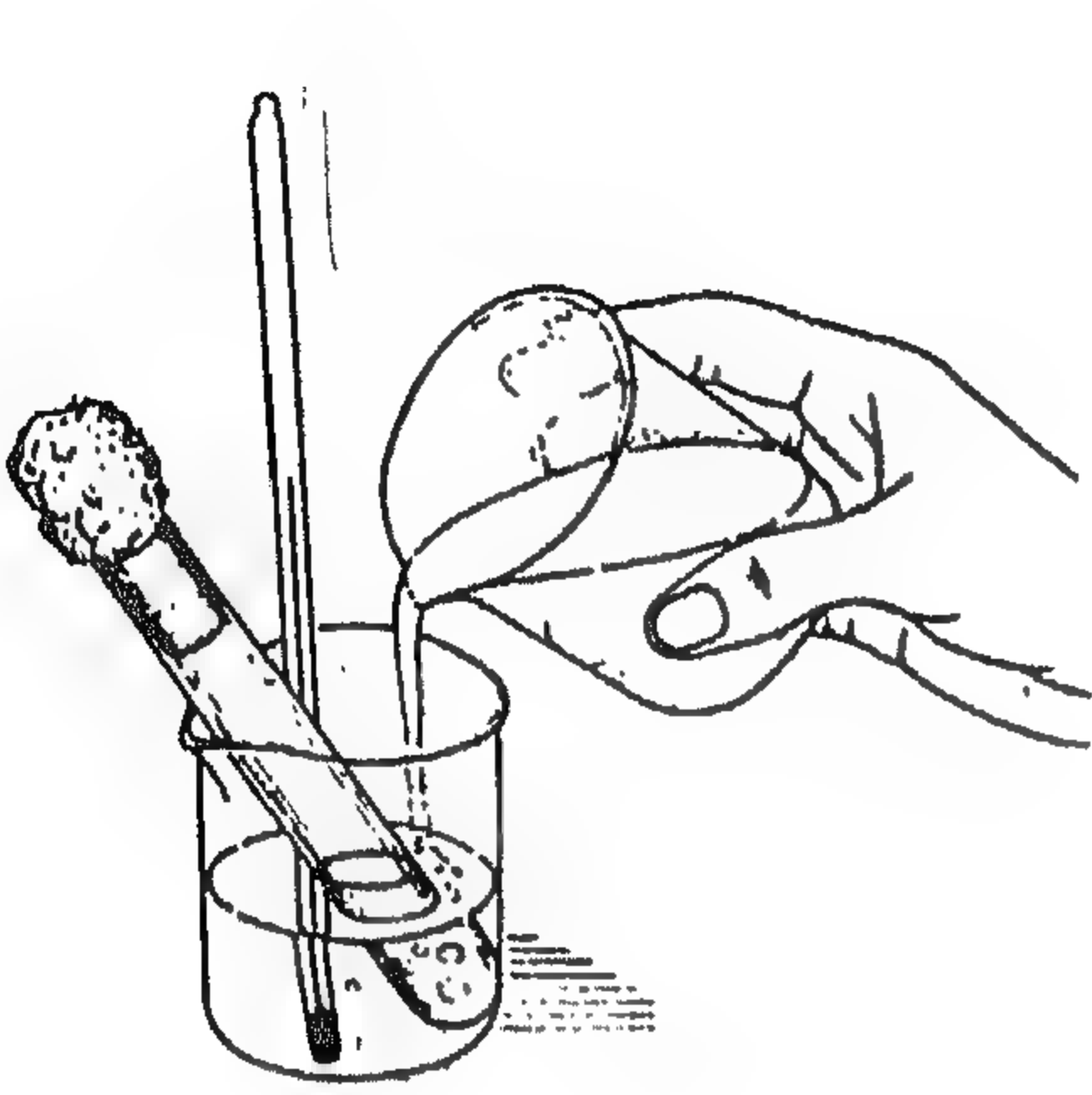
وتعتبر هذه الطريقة أفضل الطرق لتوفيرها للوقت وللاذوات اللازمة . ولكنها تتطلب مران من الدارس للحصول على نتائج جيدة حتى تصبح عادة مكتسبة لديه وفيما يلى الخطوات :-

التمرين السابع عشر (أ)

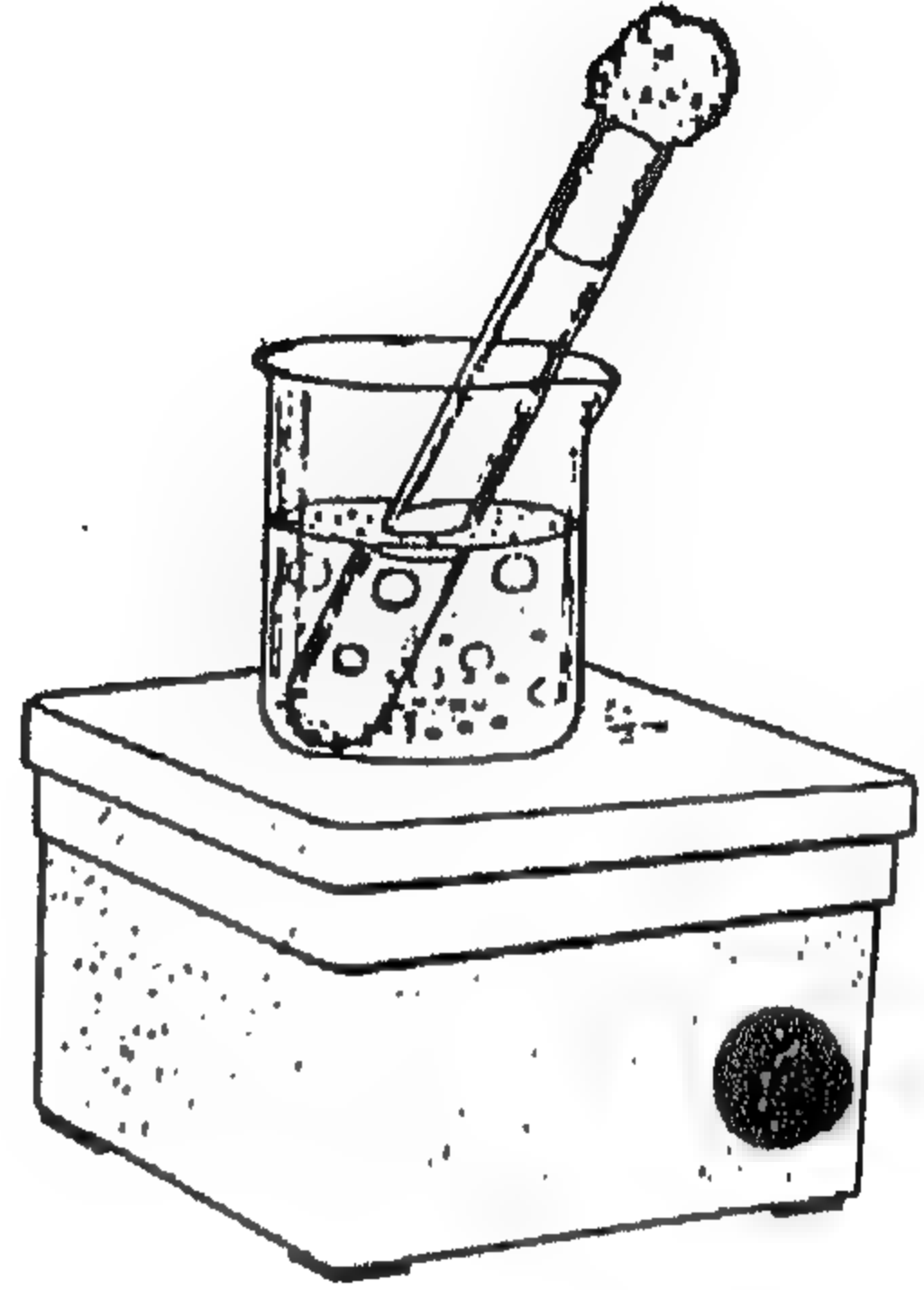
- ١- إيدء بمسح المنضدة التى تعمل عليها بالمحلول المطهر المتوفر لديك بالمعمل بإستعمال قطعة من الإسفنج .
- ٢- ضع أنبوبيتين من آجار مغذى عميق فى كأس محتوى على ماء وسخن الماء باللهب حتى الغليان وذوبان الآجار آجار - وأترك الكأس ليبرد إلى درجة ٥٠م°.
- ٣- صب محتويات الأنبوبيتين كل فى طبق بترى معقم ، راعى تسخين فوهة الأنبوبة قبل صب محتوياتها لقتل ما يكون على فوهتها من بكتيريات ملوثة، وبعد صب البيئة فى الطبق أغلقه بسرعة ثم حركه بحركة دائرية لتتشر البيئة على سطحه السفلى بإنتظام (لاحظ عدم وصول البيئة لغطاء وجانبى الطبق) . يراعى عند صب الآجار أن لا يكون مرتفع الحرارة حتى لا تتكثف المياه على غطاء الطبق ثم تتساقط قطرات الماء على الآجار بالطبق فتعمل على خلط المستعمرات الناتجة ببعضها ببعض .
- ٤- أغمس الإبرة ذات الحلقة المعقمة فى المزرعة المختلطة السائلة (مخلوط من ثلاث بكتيريات السابق ذكرها) واستعملها فى التخطيط بأحد الطرق الآتية:-

طرق التخطيط :

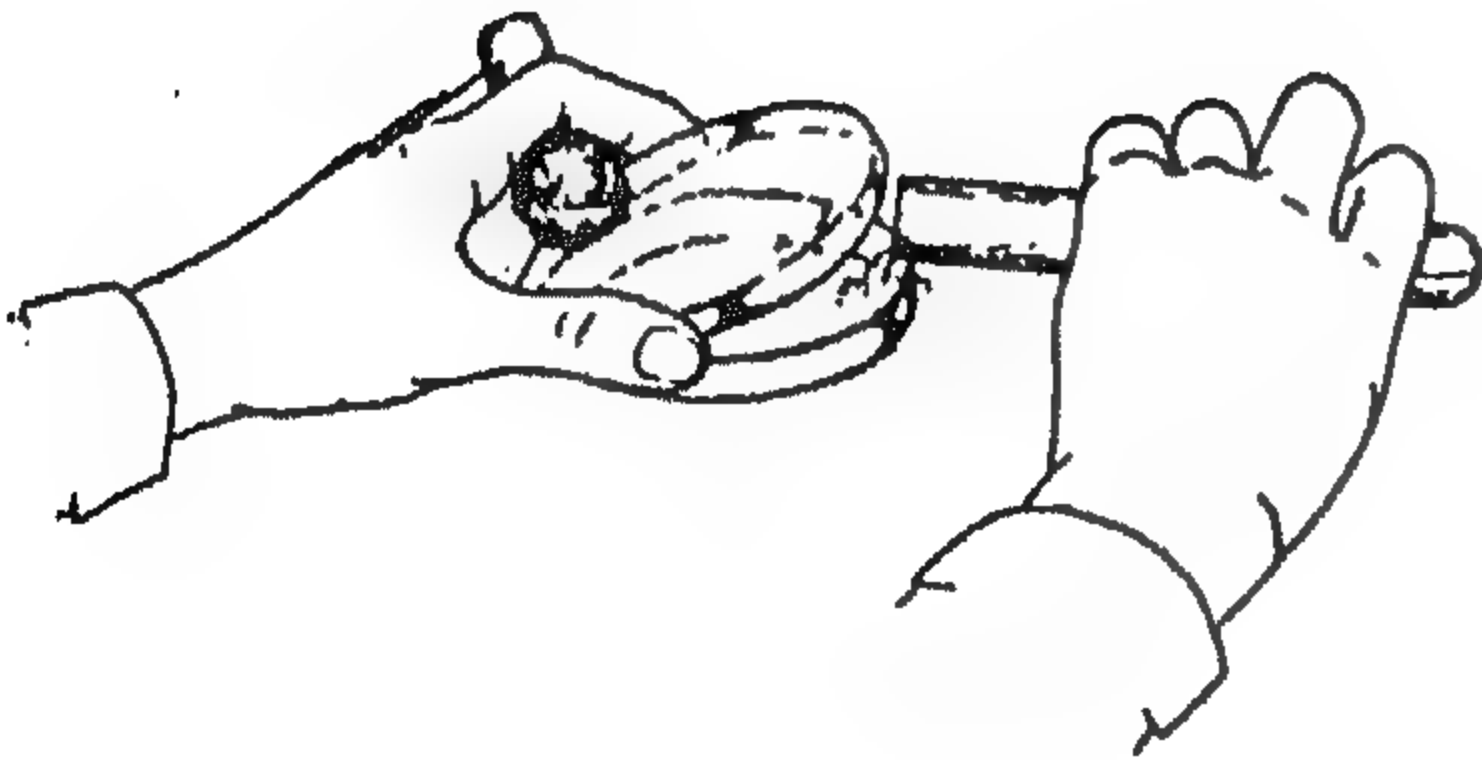
- أ- التخطيط البسيط بالطبق **Streak plate** تجرى هذه الطريقة عندما يراد توفير المواد والوقت وعندما تزداد خبرة ومران القائم بها . حيث أن إتباع هذه الطريقة مع الباحثين المدربين تعطى نتائج ممتازة فى الحصول على مستعمرات مفردة يمكن عزلها من مزارع نقية . وتجرى بإتباع الخطوات السابقة الذكر شكل (٢٦ ، ٢٧) .



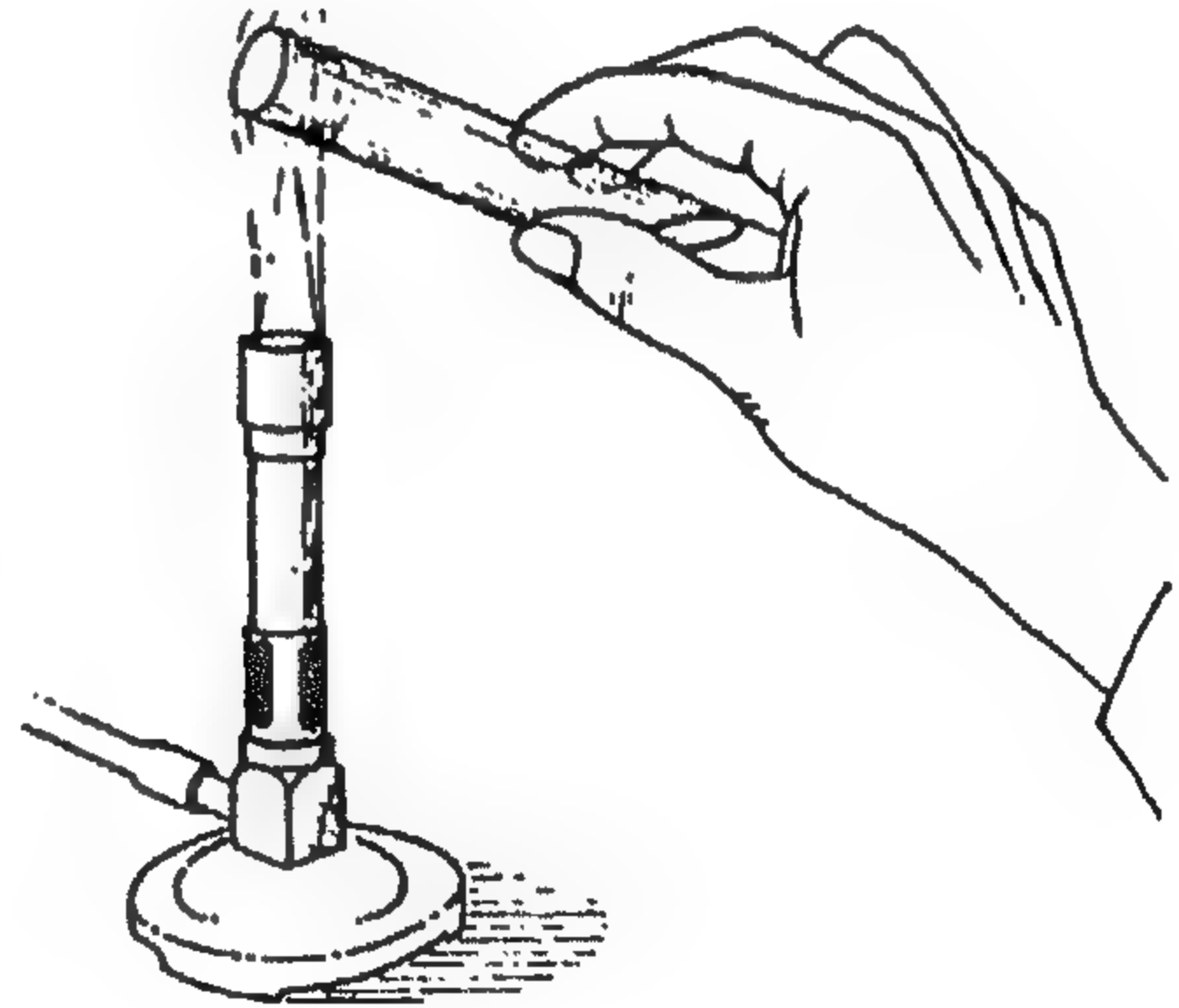
برد الآجار المغذى لدرجة ٥٠°م
بواسطة إضافة ماء بارد.



إسالة الآجار المغذى عن طريق الغليان
في حمام مائى لمدة ٥ دقائق.

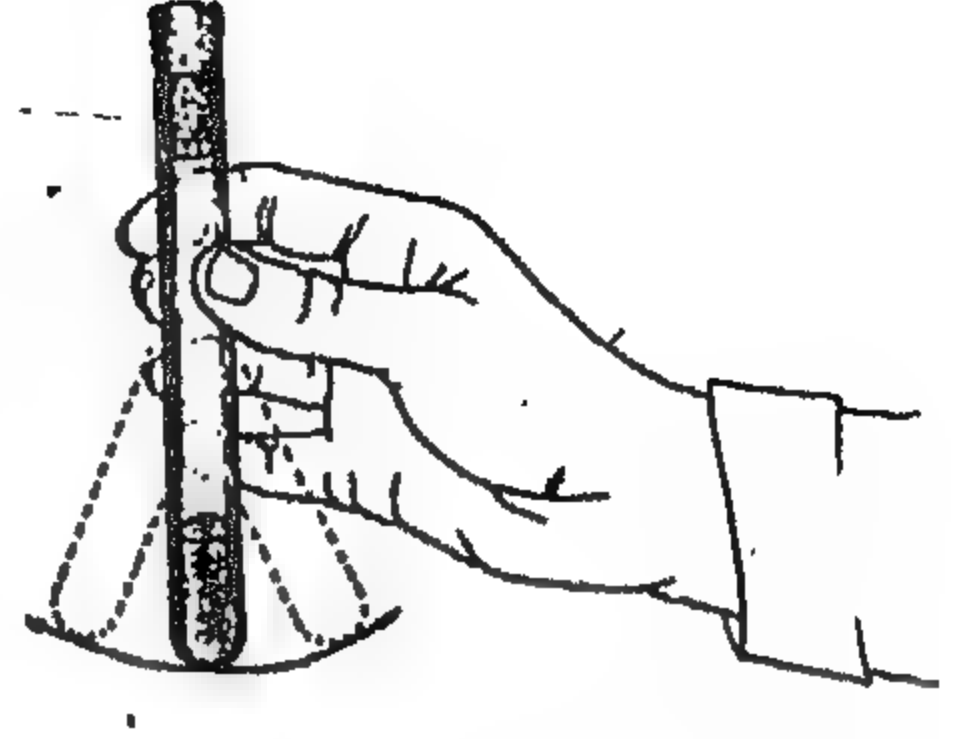
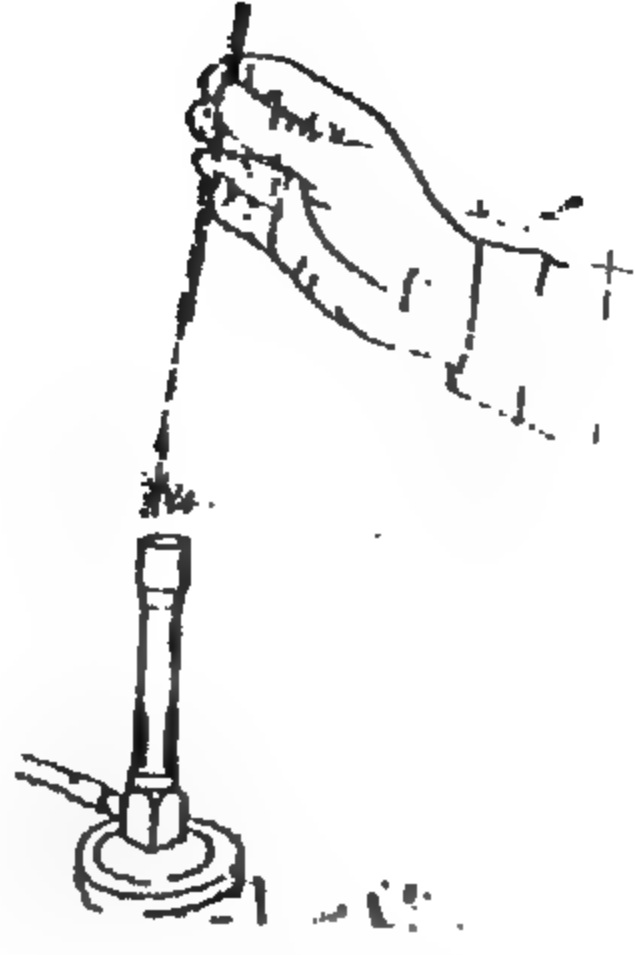
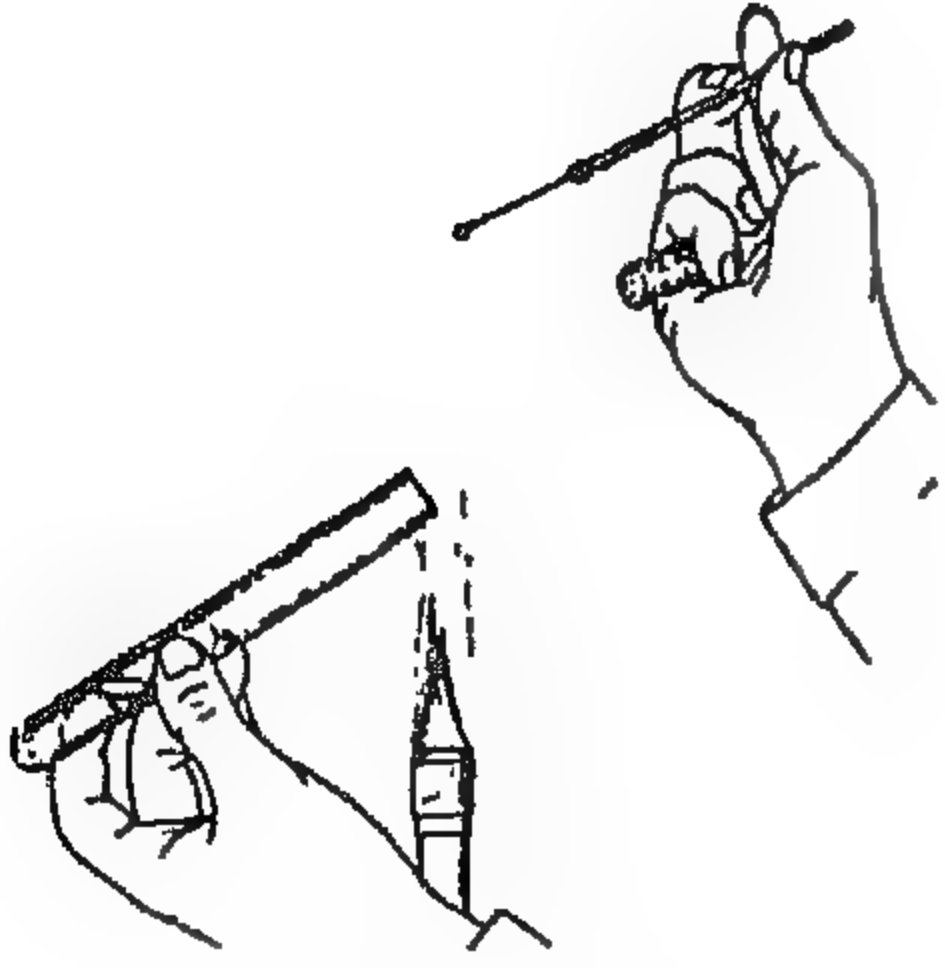


صب البيئه فى طبق بترى
وأترك الطبق يبرد.

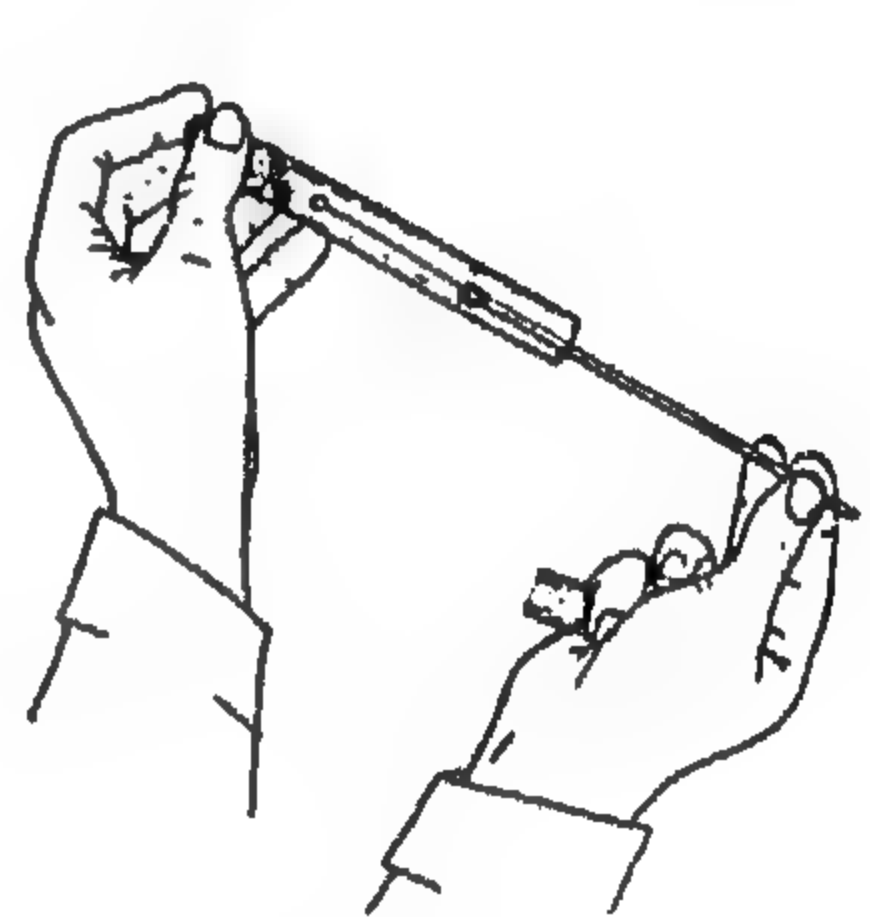
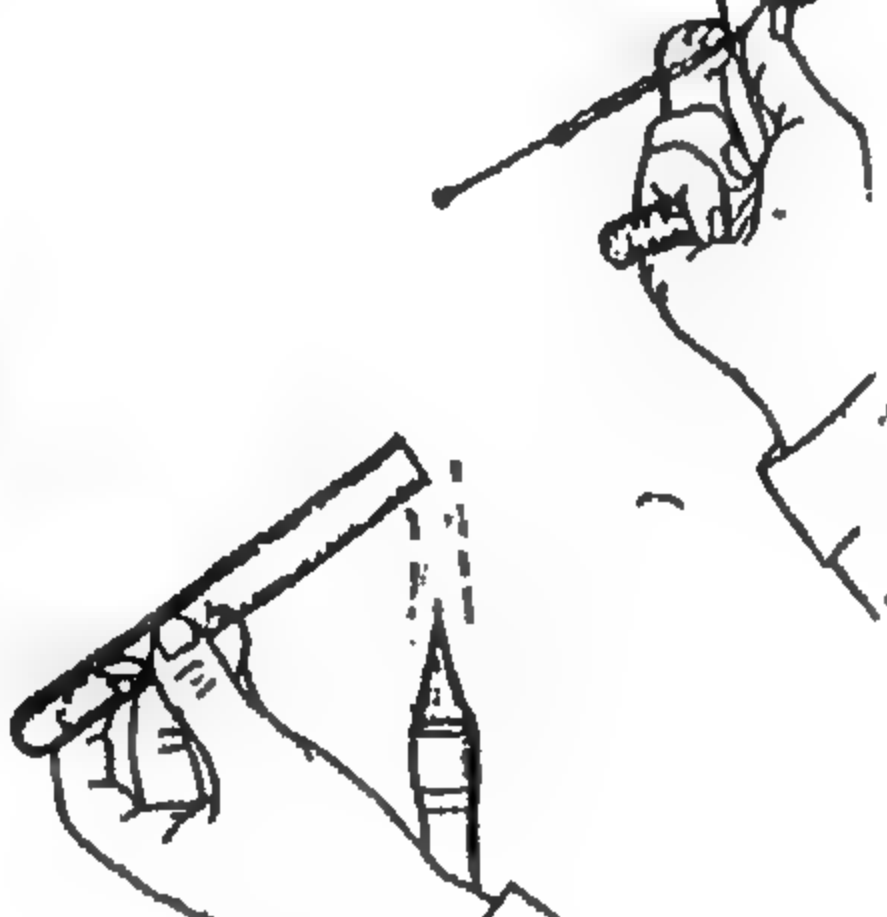
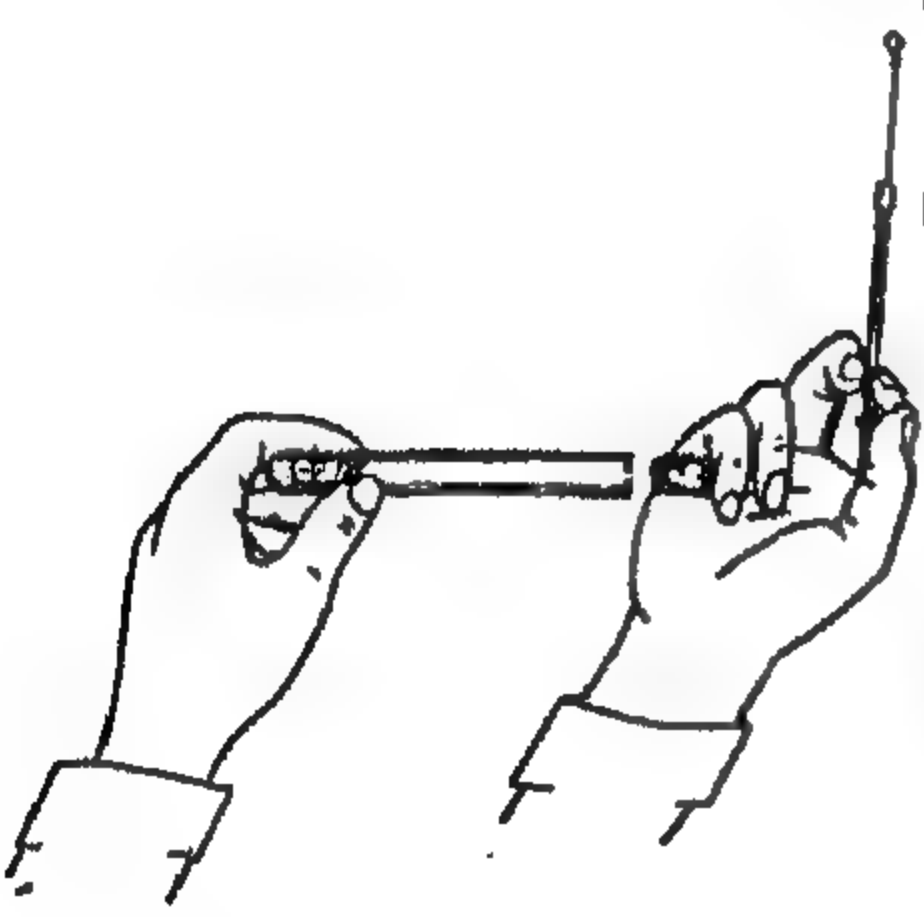


عقم فوهة الأنبوبه بعد إزالة
السدادة القطنية.

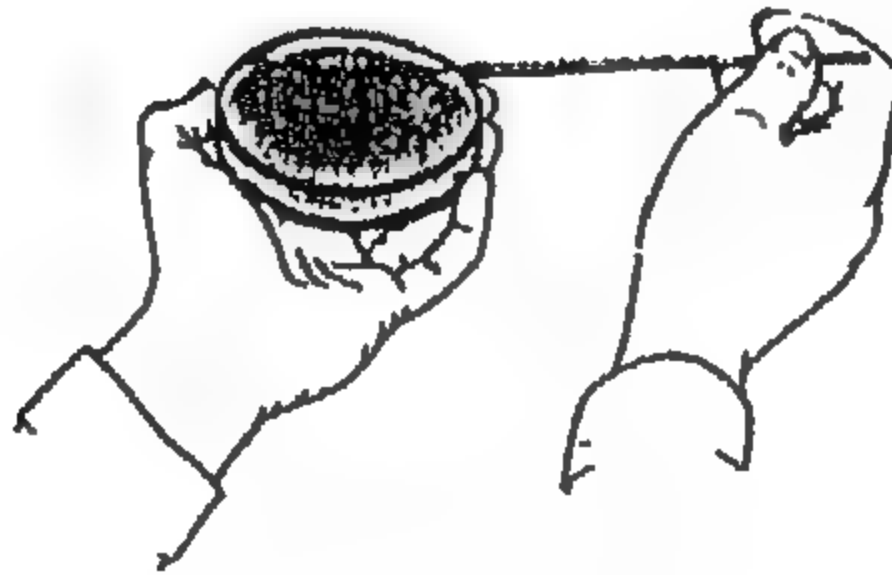
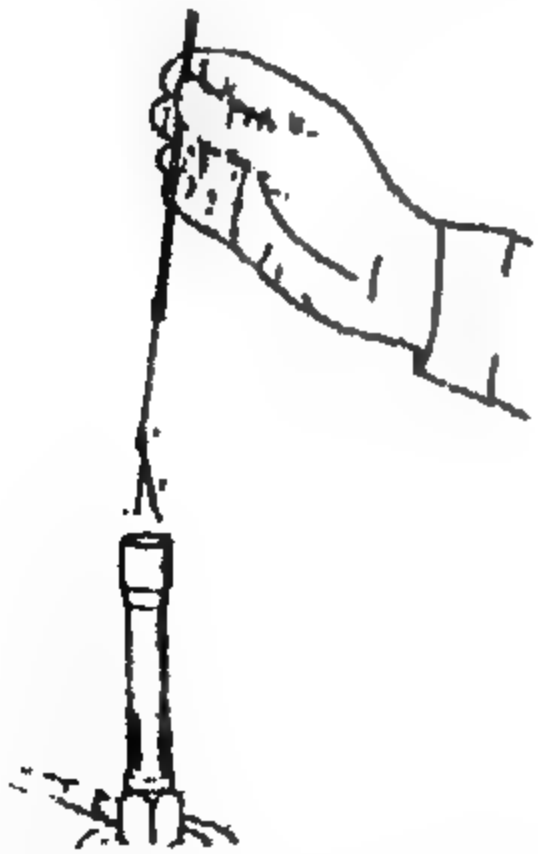
شكل ٢٦ : يوضح خطوات صب البيئه فى أطباق بترى.



(١) حرك الإنبوبة يميناً ويساراً
الحدوث توزيع متجانس للمعلق البكتيرى •
(٢) عقم الأبرة ذات العقدة بالهيب المباشر •
(٣) عقم فوهة الإنبوبة بعد نزع السدادة القطنية •



(٤) أغمس الأبرة المعقمة فى المعلق البكتيرى •
(٥) عقم فوهة الإنبوبة مره أخرى •
(٦) ضع السدادة القطنية فى فوهة الإنبوبة •



(٧) خطط سطح البيئه بواسطه الإبره ذات العقده •
(٨) عقم الإبره بعد التخطيط •

شكل ٢٧ : خطوات إجراء عملية التلقيح •

ويخطط سطح البيئة بعد تصلبها بالطبق بعد نزع غطاءه وذلك بلمس حلقة الإبرة بسطح البيئة بخفة ثم يرسم خطوط مستقيمة متصلة من أحد جوانب الطبق إلى الجانب الآخر مع مراعاة السرعة وعدم تجرح سطح البيئة • ثم يغلق الطبق مباشرة (شكل ٢٨) •

ب - التخطيط البسيط المتكرر: وتجرى هذه الطريقة بتخطيط الطبق ابتداء من رقم "١" ثم من رقم "٢" ثم من رقم "٣" شكل ٢٨ •

ج - طريقة التخطيط الرباعي Quatrant streak

أ- يفرد اللقاح بالإبرة ذات الحلقة بسرعة في منطقة صغيرة بجوار حافة الطبق (على سطح البيئة المتصلبة) وتعرف بالمنطقة رقم ١ ويراعى عدم خدش سطح الآجار ثم يغلق الطبق مباشرة •

ب - تعقم الإبرة ثم تترك لتبرد لمدة خمس ثوان ويخطط بها أربع خطوط متوازية تبدأ من المنطقة رقم واحد ومنتوية بالمنطقة رقم ٢ ثم يقل الطبق مباشرة •

ج - تعقم الإبرة مرة أخرى ثم تترك لتبرد ٥ ثوان وتجرى خمس خطوط متوازية مبتداً من المنطقة ٢ إلى المنطقة ٣ ثم يقل الطبق مباشرة •

د - تعقم الإبرة وتترك لتبرد ٥ ثوان ويخطط بها أكبر عدد ممكن من الخطوط بادئاً من المنطقة رقم ٣ إلى المنطقة رقم ٤ شكل ٢٨ •

هـ - عقم الإبرة قبل تركها •

د - طريقة التخطيط الشعاعي Radiant streak

أ- يفرد اللقاح بالإبرة ذات الحلقة بسرعة في منطقة محدودة على سطح الآجار بجوار حافة الطبق ويغلق الطبق فوراً وتعرف بالمنطقة ١ •

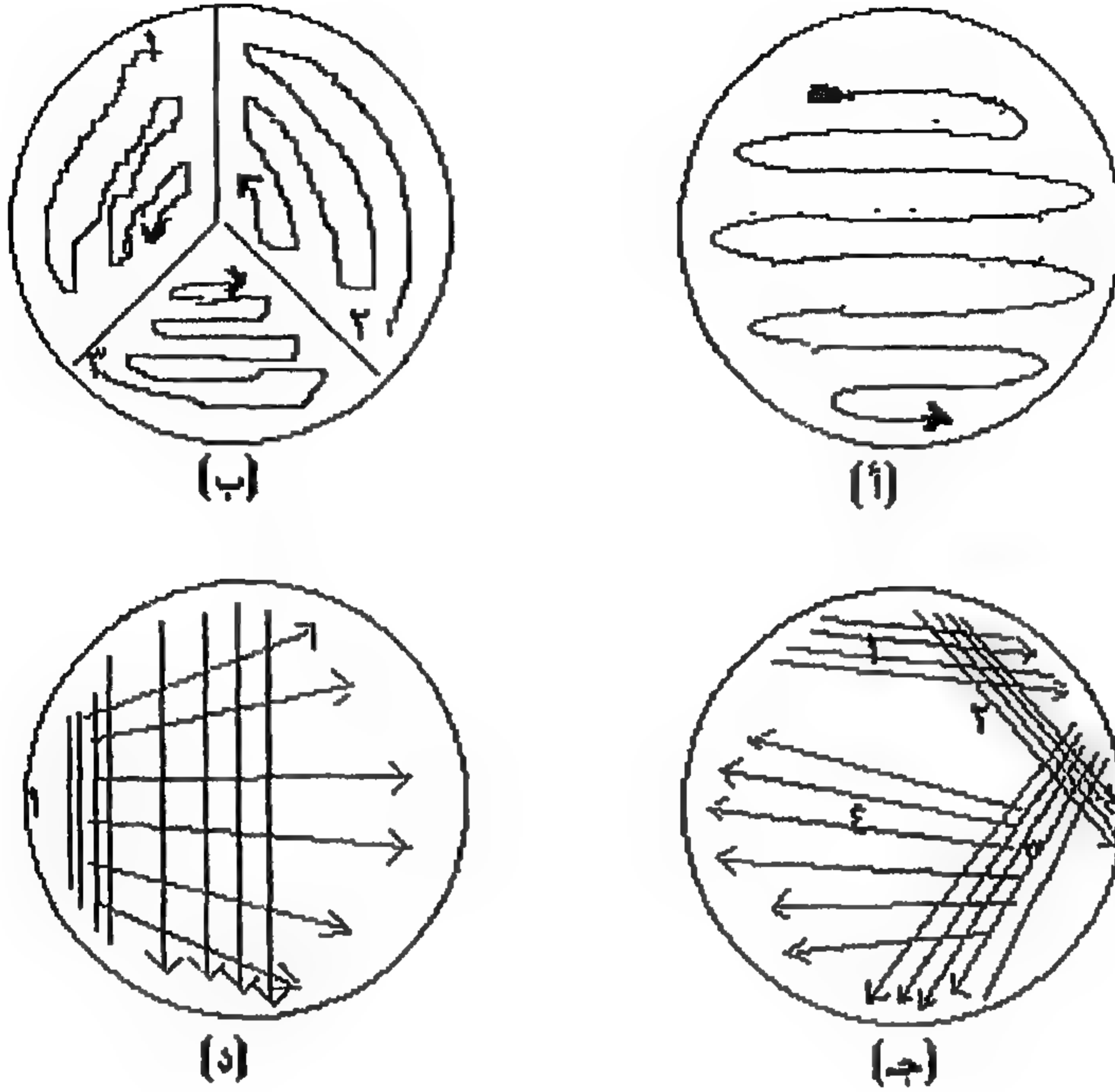
- ب - تعقم الإبرة وتترك لتبرد ٥ ثوان .
- ج - من حافة المنطقة ١ يجرى من ٧-٨ خطوط في إتجاه الحافة الأخرى من الطبق خطوط غير متوازية ويقفل الطبق فوراً .
- د - عقم الإبرة ثم أتركها تبرد ٥ ثوان ثم تجرى عدة تخطيطات متعامدة مع الخطوط السابقة وموازية لبعضها ويقفل الطبق فوراً شكل ٢٨ .
- هـ - عقم الإبرة قبل تركها على حاملها .
- و - توضع الأطباق السابق تلقيحها بالطرق الخمسة سائلة الذكر بالحضان وهي في وضع مقلوب على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة والوضع المقلوب يسمح للرطوبة التي قد تتكون على السطح الداخلي لغطاء الطبق ألا تتساقط على سطح البيئة (المزرعة) .

إختبار كفاءة طرق التخطيط المختلفة

التمرين السابع عشر (ب)

أترك الأطباق في الحضان لمدة ٤٨ ساعة على درجة ٣٧°م ثم قارن النمو البكتيري في الأطباق المخططة بالطرق الثلاث .

لاحظ أن نتائج كل طريقة تؤدي إلى ظهور مستعمرات فردية من الأنواع البكتيرية الثلاث المكونة للمخلوط . وبذلك تمكن كل من هذه الطرق الحصول على مزارع نقية بالعزل على آجار مائل .



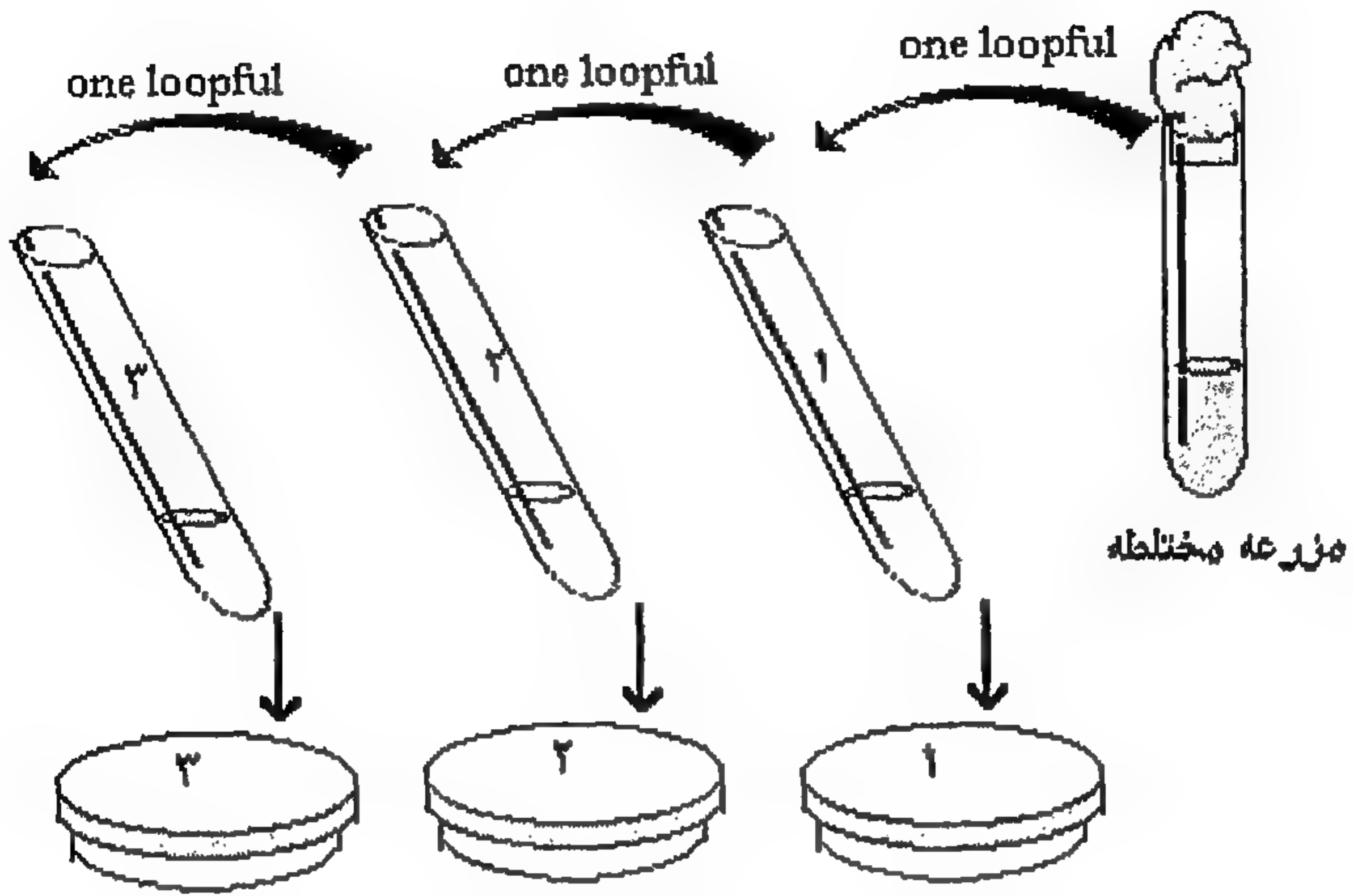
شكل ٢٧ : الطرق المتبعة في تخطيط سطح الآجار .

طريقة الصب فى الأطباق Pour plate method

فى هذه الطريقة يجرى تخفيف ما تحمله حلقة إبرة التلقيح من المزرعة المختلطة (المكونة من ٣ أنواع) فى ثلاثة أنابيب مسالة فى الآجار المغذى بحيث تلقح كل أنبوبة من التى تليها . حتى يكون بالثالثة كمية من الخلايا تكفى لإعطاء مستعمرات فردية . ومن مميزات هذه الطريقة أنها لا تحتاج إلى مهارة أو مران سابق للحصول على نتائج جيدة شكل ٢٨ . وفيما يلى خطوات التمرين .

التمرين الثامن عشر

- ١- رقم أنابيب آجار عميق ٣،٢،١ بقلم Marker ثم وضعها فى كأس محتوى على كمية من الماء ثم ضعه على شبكة من السلك فوق مصباح بنزن حتى يسيل الآجار (شكل ٢٩) .
- ٢- علم قاع ثلاث أطباق بترى معقمة بنفس الأرقام .
- ٣- برد البيئة إلى درجة ٥٠م ثم لقح الأنبوبة رقم ١ بواسطة إبرة ذات حلقه ثم إخلطها جيداً بالبيئة (لاحظ تسخين فوهات الأنبوبتين قبل وبعد فتحهما) .
- ٤- لقح الأنبوبة ٢ بواسطة إبرة معقمة ذات حلقه معبأه وحلقة مأخوذة من الأنبوبة ١ راعى تسخين فوهات الأنابيب قبل وبعد الفتح والتلقيح ثم رج الأنبوبة جيداً بين راحتي اليد وأعد الأنبوبة ١ إلى حمام مائى على درجة ٤٥-٥٠م .
- ٥- لقح الأنبوبة رقم ٣ بعبوة حلقة مأخوذة من الأنبوبة رقم ٢ . إتبع نفس خطوات رقم ٤ .
- ٦- صب محتويات الأنبوبة ٣ فى الطبق رقم ٣ يراعى عدم وصول البيئة إلى السدادة القطنية للأنبوبة .
كما يراعى رج الطبق بحركة رحوية لتوزيع البيئة .
- ٧- صب محتويات الأنبوبتين ١ ، ٢ فى الأطباق المناظرة بنفس الطريقة .
- ٨- أترك الأطباق لتتصلب بها الآجار ثم ضعها بالحضان مقلوبة على درجة ٣٧م لمدة ٤٨ ساعة .
- ٩- إفحص الأطباق ولاحظ مدى تباعد المستعمرات بعضها عن بعض .
فى الطبق ١ لاحظ درجة تزام المستعمرات بمقارنتها بالطبق ٢ أو الطبق ٣ والآخر سوف يحتوى على مستعمرات متباعدة يمكن عزل كل منها على حدة والحصول على ثلاث مزارع نقية على آجار مائل لكل من الثلاث أنواع .



شكل ٢٩ : طريقة الصب في الأطباق .

التقدير الكمي للنمو البكتيري

Quantitative measurements of Bacterial growth

بالرغم من أن دراسة الصفات المزرعية والمظهرية للنموات البكتيرية تعتبر من الدراسات الوصفية الهامة، إلا أن التقدير الكمي للنموات البكتيرية يعتبر أساساً لكثير من الدراسات الأساسية والتطبيقية. فمثلاً تتخذ كمية النمو أساساً لتقدير تأثير كثير من المعاملات الفيزيائية أو الكيماوية على نمو البكتيرات وتكاثرها. كما تتخذ أساساً في التقدير الحيوى للفيتامينات وبعض الأحماض الأمينية وفي قياس مدى نشاط الكائنات البكتيرية فى إحداث التغيرات الكيماوية لبعض مواد التفاعل المعينة وغير ذلك من الدراسات.

ولتقدير النمو تقديراً كمياً دقيقاً يوجد عديد من الطرق المختلفة فى أسسها والمتحدة فى أهدافها. ونظراً لإتساع مجال هذه الطرق فإن ذلك يتيح للدارس الفرصة فى إتباع الطريقة التى تتناسب مع إمكانياته.

أولاً: التقدير المباشر لعدد الخلايا Cell count

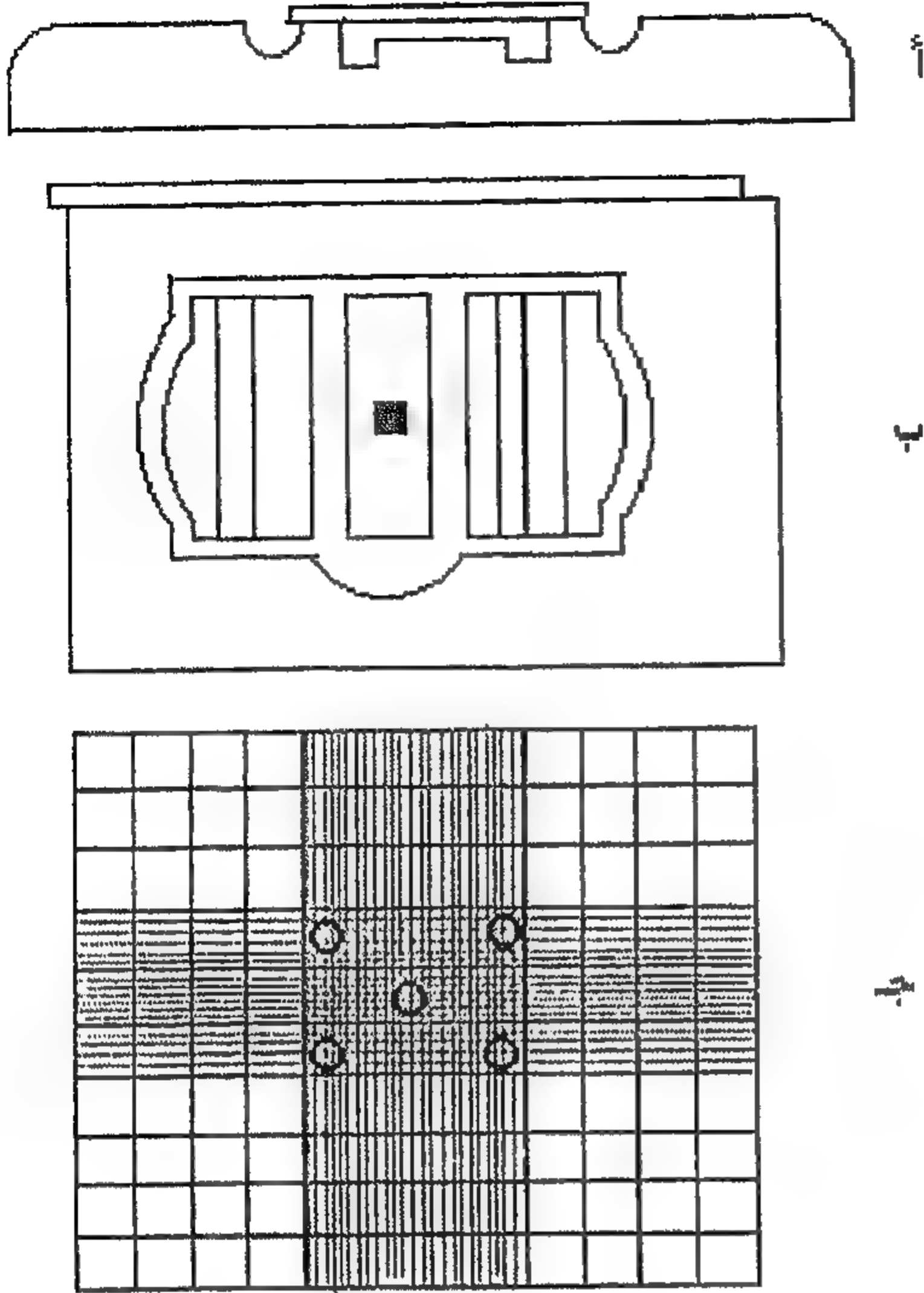
يمكن القيام بتقدير عدد الخلايا مباشرة فى عينة من المزرعة. وذلك بالإستعانة بالميكروسكوب وتتميز هذه الطريقة بسهولة إجرائها وسرعة الحصول على نتائجها. إلا أنها طريقة مجهدّة للنظر رغم إستعمال أغشية بكتيرية مصبوعة لسهولة رؤية الخلايا.

هذا ومن الملاحظ أن العد المباشر للخلايا المثبتة والمصبوغة لا يميز بين الخلايا الحية والأخرى غير الحية. ولإجراء ذلك توجد عدة طرق.

(١) استعمال شرائح زجاجية خاصة:

التمرين التاسع عشر

- ١- حضر مزرعة حديثة السن (٤٨ ساعة) من كل من *Bacillus subtilis*, *E.coli* نامية في بيئة مرق مغذى.
- ٢- حضر شريحة بتروف هاوسر Petroff-Hausser أو شريحة قياسية لعد كرات الدم Haemocytometer وعدداً من أغشية الشرائح النظيفة. (تتميز هذه الشرائح بوجود حجرات صغيرة ذات حجم معين، كما تحتوى على تقسيمات دقيقة بشكل مربعات).
- ٣- إسحب بواسطة ماصة مدرجة معقمة كمية من المزرعة البكتيرية بعد رجها جيداً وضع بواسطتها بضع قطرات على سطح الشريحة لتكفى لغمر حجرة العد بالشريحة، ثم غطها مباشرة بغطاء شريحة نظيف.
- ٤- إفحص الشريحة بالميكروسكوب يفضل استعمال طريقة الحقل المظلم. قدر عدد الخلايا في حوالى ٢٠٠ مربع، يراعى عند العد حساب الخلايا تلك التى توجد فوق الضلعين المكونين للزاوية اليسرى من المربع.
- ٥- قدر متوسط عدد الخلايا بالمربع الواحد ومنها يمكن عن طريق عملية حسابية، تختلف باختلاف الشريحة المستعملة (شكل ٣٠)، تقدير عدد الخلايا فى ١ مل من المزرعة البكتيرية المستعملة.



- شكل ٣٠ : شريحة بيتروف-هاوسر Petroff-Hausser
لتقدير عدد الخلايا البكتيرية .
أ - قطاع طولى مستعرض
للشريحة فى موضع يمر
بمركز الشريحة ، يلاحظ كيفية
وضع غطاء الشريحة .
ب - منظر عام للشريحة ،
المربع الغامق فى مركز
الشريحة هو المنطقة المقسمة
والمبينة فى جـ . حيث
يقدّر عدد خلايا البكتيريا فى
عدد من المربعات المتماثلة
كتلك المحددة بدوائر فى شكل
جـ .

(ب) استعمال شرائح زجاجية عادية:

التمرين العشرون

- ١- حضر مزرعة حديثة السن من كل من *E.coli* , *Bacillus subtilis* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٤٨ ساعة .
- ٢- حضر شريحتين عاديتين نظيفتين . ضع كل منهما فوق قطعة من الورق رسم عليها مربع مساحته اسم^٢ بحيث يقع المربع فى منتصف الشريحة .
- ٣- رج أحد المزارع البكتيرية جيداً ثم أنقل كمية ٠,٠١ مل فى وسط المربع بأحد الشرائح بواسطة ماصة معقمة ومدرجة سعة ٠,١ مل . وبواسطة ماصة أخرى أنقل نفس الكمية من المزرعة الأخرى إلى وسط المربع فى

الشريحة الثانية (يمكن نقل الكمية بإستعمال إبرة زرع ذات عقدة سعتها ٠,١ مل) .

٤- إفرد ماتحملة العقدة على كل مساحة المربع بكل شريحة بواسطة

إبرة التلقيح .

٥- جفف الشريحة على سطح مستو دافئ بحيث يتم التجفيف خلال

خمس دقائق . ثم ثبت الغشاء بالتمرير فوق اللهب . (فى حالة تقدير عدد

البكتيريات باللبن تؤخذ كمية متساوية من اللبن ويحضر منها غشاء مثبت ولكن

يزال ما يحتويه من دهن بتعريض الغشاء المثبت إلى الزيلول ثم يترك الغشاء

ليجف بالهواء) .

٦- يصبغ الغشاء بصبغة أزرق الميثيلين لمدة نصف دقيقة ثم تغسل

الشريحة بالماء وتجفف .

٧- إفحص عشرة حقول مجهرية مسجلاً النتائج بطريقتين:

(أ) تقدير عدد جميع الخلايا بالحقول الواحد (المفردة والمتجمعة) .

(ب) تقدير عدد الخلايا المفردة فقط بكل حقول .

٨- إحسب عدد الخلايا فى ١ مل من المزرعة الأصلية المختبرة

ولإجراء ذلك تحسب أولاً مساحة الحقل الميكروسكوبى على أساس المعادلة (ط

نق ٢) ويمكن قياس قطر الحقل بالإستعانة بالميكروميتر العينى المعايير . ولما

كانت كمية المزرعة المستعملة ٠,١ مل وهى تتشر فى مساحة اسم ٢ فإنه

يمكن تقسيم هذه المساحة على مساحة الحقل المجهرى فيمكن التعرف على عدد

الحقول المجهرية فى مساحة الغشاء . ومن حاصل ضرب متوسط عدد الخلايا

البكتيرية بالحقول الواحد \times عدد الحقول المجهرية، يمكن الحصول على عدد

الخلايا فى كمية ٠,١ مل من العينة المستعملة . وبضرب الناتج $\times ١٠٠$ نحصل

على عدد الخلايا فى ١ مل من المزرعة أو العينة المستعملة .

ثانياً: التقدير غير المباشر لعدد الخلايا

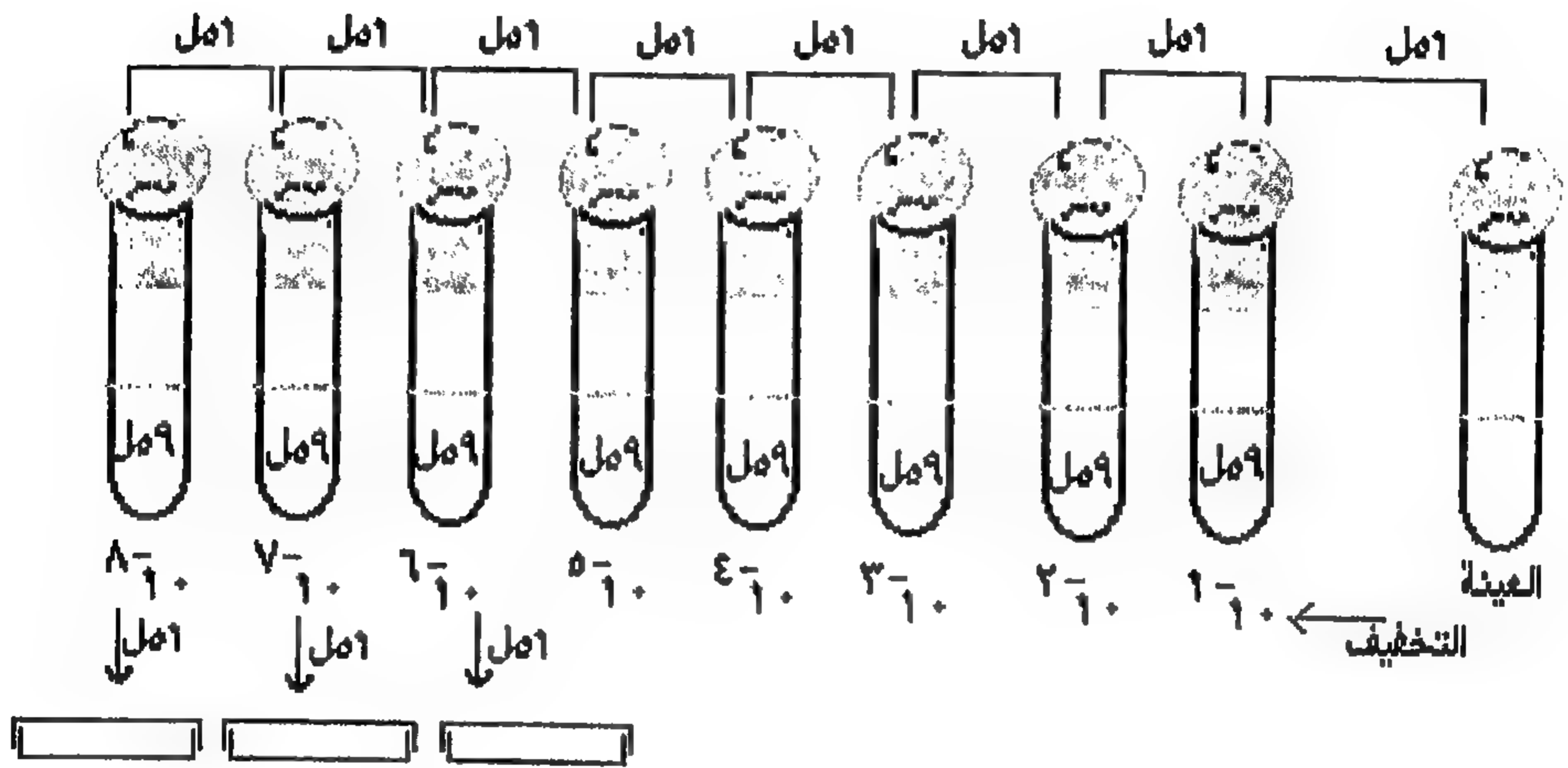
يمكن بهذه الطريقة تقدير عدد الخلايا الحية ذات القدرة على التكاثر تحت الظروف المناسبة لنموها . لذلك يجب استعمال البيئة الغذائية المناسبة، وتعرض المزرعة لظروف التحضين المثالية للنوع البكتيري المراد تقدير عدد مستعمراته، ويجرى ذلك باستعمال طريقة العد بالأطباق Plate count (شكل ٣١) .

التمرين الواحد والعشرون

- ١- رج المزرعة البكتيرية النامية في بيئة المرق المغذى جيداً لكي تتوزع بها الخلايا بانتظام . ثم انقل ١ مل منها بواسطة ماصة معقمة إلى أنبوبة تحتوي على ٩ مل ماء معقم أو بيئة معقمة لتحصل على تخفيف ١:١٠ أى 10^{-1} .
- ٢- رج المعلق المخفف جيداً بالأنبوبة ثم انقل منها ١ مل بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى أنبوبة تحتوي على ٩ مل ماء معقم أو بيئة معقمة لتحصل على تخفيف ١: ١٠٠ أى 10^{-2} .
- ٣- كرر الخطوة السابقة عدة مرات حتى تحصل على تخفيفات تصل إلى 10^{-1} ، $10^{-٢}$ ، $10^{-٣}$ ، مستخدماً ماصة معقمة في كل مرة .
- ٤- أنقل ١ مل من كل من التخفيفات الأخيرة $10^{-١}$ ، $10^{-٢}$ ، $10^{-٣}$ إلى طبق بترى معقم مع مراعاة تحضير طبقين لكل تخفيف .
- ٥- أضف إلى كل طبق كمية كافية (لاتزيد عن ١٥ مل) من بيئة الآجار المغذى المسالة والمبردة إلى درجة 50°م . أخلط محتويات كل طبق جيداً وذلك بتحريكه إلى الأمام وإلى الخلف عدة مرات ثم أتركه ليتصلب .
- ٦- ضع الأطباق في الحضان في وضع مقلوب على درجة 37°م لمدة يومين .

٧- انتخب التخفيف المناسب الذى يظهر عدد من المستعمرات يتراوح بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة بالطبق الواحد، احسب متوسط عدد المستعمرات بالطبق الواحد.

٨- احسب عدد الخلايا الحية فى ١ مل من المزرعة الأصلية وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات فى الطبق فى مقلوب التخفيف المستعمل به.



شكل ٣١ رسم تخطيطى يبين الخطوات المتبعة لإجراء تقدير النمو على أساس عدد الخلايا ذات القدرة على التكاثر (طريقة العد بالأطباق Plate count).

ثالثاً : تقدير الوزن الجاف للخلايا

تقتضى بعض الدراسات تقدير النمو البكتيرى على أساس الوزن الجاف للخلايا باعتبار أن الخلية البكتيرية تحتوى على ٩٠% ماء وهذه النسبة تختلف تبعاً للنوع البكتيرى. وعند تقدير الوزن الجاف للخلايا يجب التخلص من آثار البيئة النامية عليها بغسل الخلايا عدة مرات بالماء المقطر والمعقم.

التمرين الثانى والعشرون

- ١- جهز مزرعة من البكتيره *E. coli* نامية فى بيئة مرق مغذى لمدة ٢٤ ساعة.
- ٢- رج المزرعة جيداً ثم أنقل منها كمية ١٠ مل إلى أنبوبة طرد مركزى نظيفة.
- ٣- أفصل الخلايا عن البيئة بتشغيل جهاز الطرد المركزى بسرعة ١٠,٠٠٠ الفة بالدقيقة لمدة ١٠ دقائق ، ثم تخلص من البيئة الرائقة فوق الخلايا .
- ٤- أضف إلى الخلايا كمية ١٠ مل من ماء مقطر معقم، رجها جيداً لغسل الخلايا ثم افصل الخلايا بالقوة المركزية الطاردة بنفس السرعة ونفس المدة مرة ثانية ثم تخلص من الراشح .
- ٥- كرر الخطوة السابقة مرة أخرى ليتم غسيل الخلايا ثلاث مرات ثم أضف للخلايا المغسولة والمترسبة كمية ١٠ مل من الماء المقطر ورجها جيداً ثم أنقل أحجام موحدة منها (١مل) إلى بواتق سبق تثبيت وزنها بعيداً عن الرطوبة .
- ٦- جفف العينات المأخوذة فى فرن الهواء الساخن على درجة ١١٥م لمدة ١٢ ساعة.
- ٧- إحسب وزن الخلايا الجاف فى المزرعة المستعملة وذلك على أساس عدد المليجرامات فى كمية ١,٠ مل من المزرعة.

رابعاً: تقدير الآزوت الكلى بالخلايا

تعتمد هذه الطريقة على أن غالبية الخلايا البكتيرية تتكون من البروتين وحيث أن الآزوت هو أهم مكونات البروتين فإن تقدير الآزوت الكلى بالمزرعة أو بعينة منها يكون متلازماً مع كمية النمو (عدد وحجم الخلايا) • وعادة تقدر نسبة النيتروجين بالبروتين البكتيري بحوالى ١٤٪ من الوزن الجاف للبروتوبلازم، هذا ويجب أن نعلم أن هذه النسبة ليست ثابتة لأنواع البكتيرية المختلفة وحتى فى النوع الواحد تحت مختلف الظروف البيئية •

التمرين الثالث والعشرون

- ١- حضر معلق من الخلايا المغسولة وذلك باستعمال القوة المركزية الطاردة ثلاث مرات مع الغسيل بالماء المقطر المعقم فى كل مرة •
- ٢- ضع ٢ مل معلق الخلايا المغسولة فى دورق كداهل الدقيق سعة ٣٠ مل ثم أضف إليه ٢ مل من مزيج هضم البروتينات •
- ٣- سخن محتويات الدورق حتى يتم ترويق المحلول ثم استمر فى الغليان الهادىء لمدة ساعة • بعد ذلك اترك المحلول ليبرد •
- ٤- أضف ٥ مل من محلول مركز من الصودا الكاوية (١٠ أساسى) ثم أضف إلى المزيج كمية كافية من مادة مانعة للرغوة مثل حمض الأوليك أو مادة السيليكون •
- ٥- أوصل الدورق فى الحال بجهاز تقطير صغير متصل بأنبوبة استقبال مدرجة تحتوى على ٢ مل حمض كبريتيك ٢٠/١ أساسى مع مراعاة غمر أنبوبة التوصيل أسفل سطح الحمض فى أنبوبة الإستقبال •
- ٦- سخن للغليان لمدة ٥ دقائق ثم ارفع أنبوبة التوصيل فى الدقيقة الأخيرة من الغليان فوق سطح الحمض •

٧- خفف المحلول الناتج بكمية معلومة من الماء المقطر بحيث يحتوى المخلوط الناتج على ١٠- ١٥ ميكروجرام آزوت فى المليليتر الواحد تقريباً .
 ٨- أضف إلى كمية ٢ مل من السائل المخفف كمية مساوية (٢مل) من محلول نسلر Nessler solution ، ٣ مل من محلول الصودا الكاوية (٢ أساسى) وذلك فى أنبوبة قياس اللون .

٩- أترك الأنابيب لمدة ١٥ دقيقة فى درجة حرارة الغرفة ثم قس درجة التلوين باستعمال جهاز تقدير الألوان Colorimeter مستخدماً موجة ضوئية ذات طول ٤٤٠ nm .

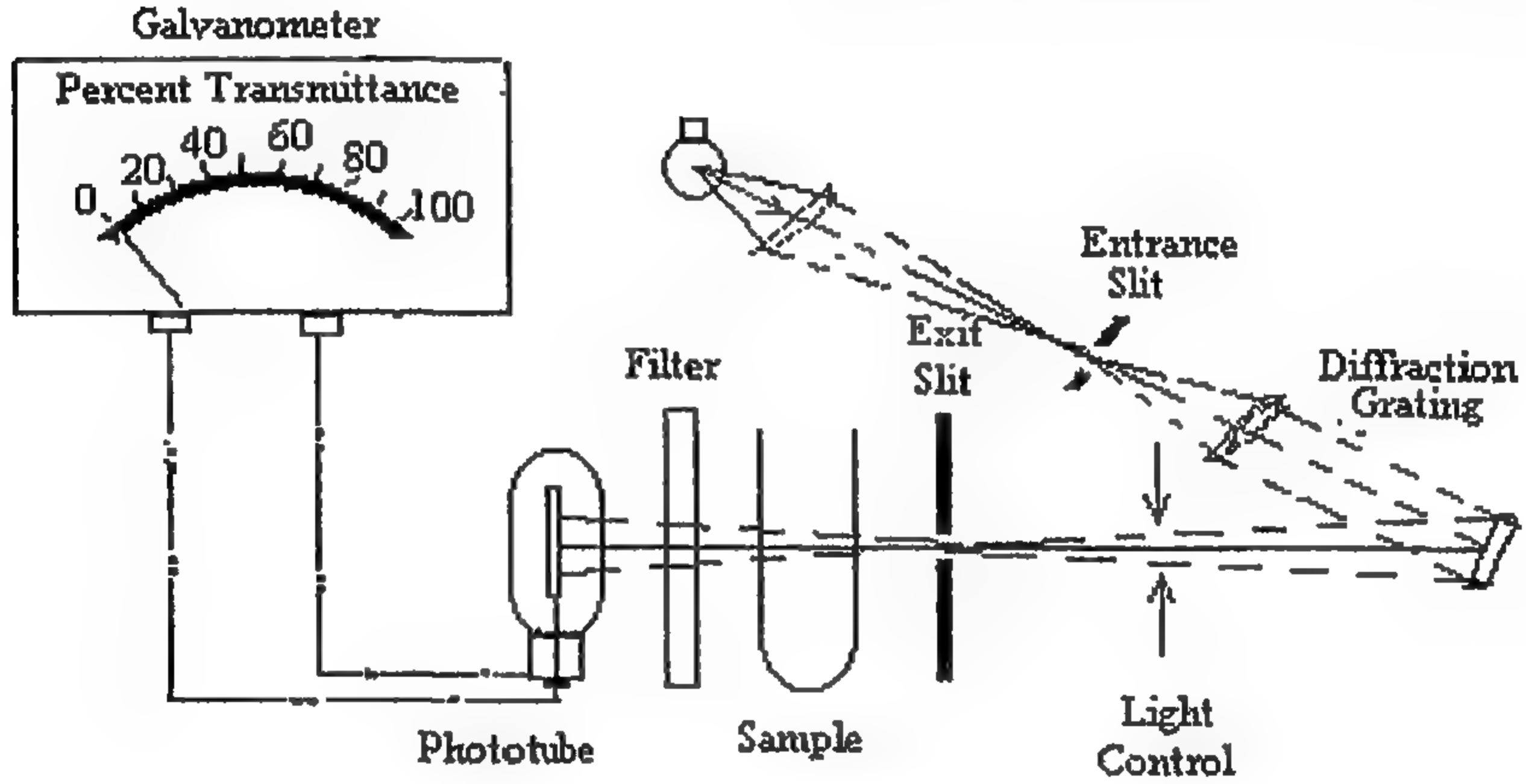
١٠- قدر آزوت الأمونيا بالمليجرام / ١مل من المزرعة البكتيرية مستعيناً على ذلك بالرسم البيانى القياسى السابق تجهيزه باستعمال محاليل من الأمونيا معروف محتوياتها من الأزوت .

خامساً: تقدير درجة التعكير Turbidimetry

تعتمد هذه الطريقة على أنه كلما زادت درجة تعكير المزرعة (زيادة كمية النمو) كلما قلت كثافة الأشعة الضوئية النافذة خلال هذه المزرعة ، فإذا استعمل جهاز لقياس الضوء النافذ خلال مزرعة بكتيرية سائلة أو معلق بكتيرى فى ماء مقطر فإنه يمكن قياس كثافة الشعاع النافذ باستعمال وحدة ضوئية حساسة ويلاحظ أن كثافة الشعاع تكون متلازمة عكسياً مع درجة تعكير المزرعة ، ويستعمل لذلك أجهزة خاصة تقيس درجة عكارة المزارع والمحاليل تعرف باسم Turbidimeters .

وطرق قياس درجة التعكير من أكثر الطرق المتبعة فى قياس النمو البكتيرى كمياً وذلك لسرعتها ودقتها وقلة المعدات اللازمة إلا أنه يصعب اتباع

هذه الطريقة في حالة الخلايا الملونة بدرجة كبيرة أو التي تفرز صبغات في البيئة بدرجة واضحة، وفي الحالة الأخيرة قد تستعمل طرق قياس بصرية أخرى مثل Colorimetry أو Spectrophotometry (شكل ٣٢) وفي كل حالة يراعى إختيار الموجة الضوئية المناسبة لكل نوع بكتيرى تبعاً للونه وهى الموجة التى تكون فيها درجة إمتصاص الخلايا أو المحلول أو المعلق المستعمل أكبر ما يمكن وتحدد هذه الموجات أو لأبتعريض المعلق لعدة موجات ضوئية وذلك باستعمال مرشحات ضوئية مختلفة ثم تختار الموجة التى يحدث عندها أكبر إمتصاص ضوئى أى أقل نسبة % للنفاذية الضوئية.



شكل ٣٢ : رسم تخطيطى للإسبكتروفوتوميتر

التمرين الرابع والعشرون

- ١- حضر مزرعة حديثة من البكتيره *E. coli* نامية فى بيئة سائلة .
- ٢- إملأ أحد الأنابيب الخاصة بجهاز قياس الضوء Colorimeter بتخفيفات معلومة من المزرعة بعد رجها جيداً، إملأ أنبوبة أخرى بالبيئة

المستخدمة في تنمية البكتيره المراد تقدير نموها • (١:١) - (٢:١) - (٤:١) - (٨:١) - (١٦:١) قدر درجة نفاذية الضوء Transmittance % لكل تخفيف بالمقارنة بالبيئة •

٣- في حالة استعمال بيئة عديمة اللون يستعمل مرشح ضوئي يعطى موجات ضوئية بطول ٤٢٠ mμ ، أما في حالة استعمال بيئة صفراء أو بيضاء اللون يستعمل مرشح ضوئي يوفر موجات بطول ٦٠٠ mμ •

٤- دون قراءات الكثافة الضوئية للمزرعة Optical density وهذه القراءات تكون متلازمة طردياً مع درجة تعكير البيئة مع رسم خط بياني بين هذه العلاقة •

وتبعاً لقانون Lambert & Beer فإن الكثافة الضوئية للمزرعة = ٢- لو غار يتم النسبة المئوية لدرجة نفاذية الضوء Transmittance % خلال المزرعة •
سادساً: تقدير درجة إنتاج الحمض بالمزرعة

يقدر النمو كمياً عن هذا الطريق عادة في بكتيره حمض اللاكتيك وغيرها من البكتيرات التي تتميز بإنتاج أحماض أثناء نموها بدرجة تكفي لقياسها •

التمرين الخامس والعشرون

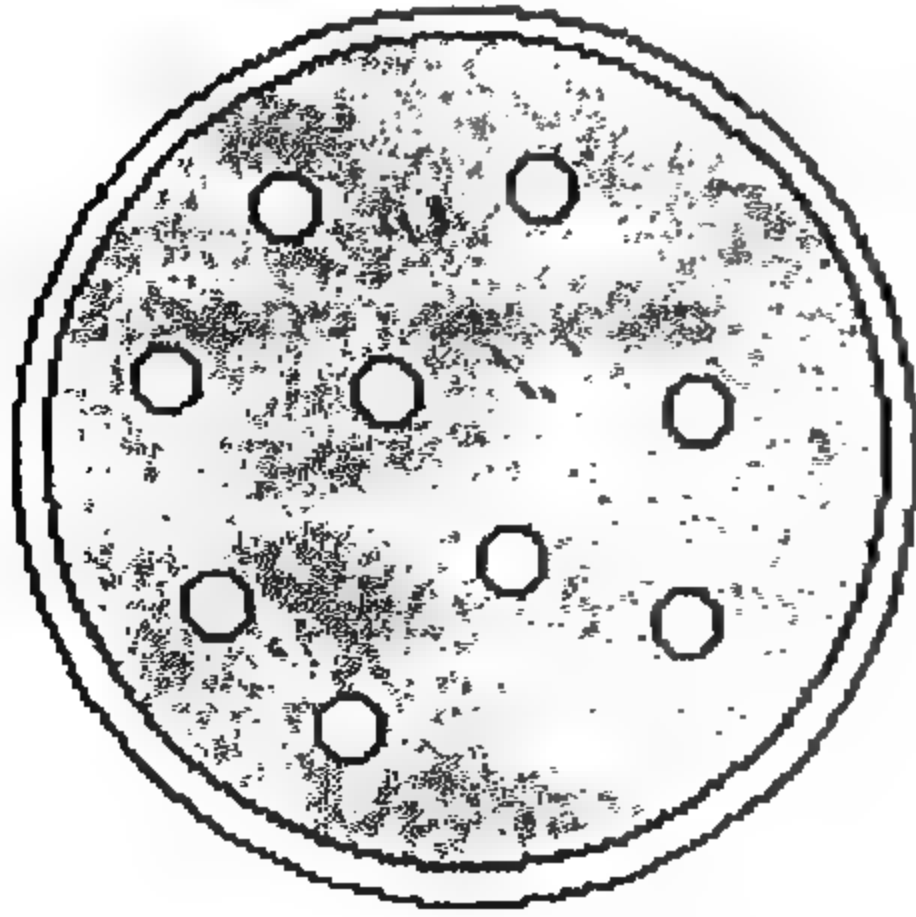
- ١- حضر عدة مزارع من البكتيره *Lactobacillus bulgaricus* ونامية في بيئة اللبن لمدة ١٢، ٢٤، ٤٨ ساعة •
- ٢- انقل ١٠ مل من كل مزرعة إلى ورق مخروطي نظيف، أضف إليها عدة نقط من دليل الفينولفثالين •
- ٣- عادل حموضة العينة باستعمال محلول صودا كاوية ١٠٠/١ أساسى •
- ٤- احسب عدد ملليايترات الصودا الكاوية المستعملة وهي عادة تتناسب طردياً مع درجة حموضة المزرعة المختبرة •

عزل وتنمية البكتيريوفاجات

Bacteriophage isolation and culture

البكتيريوفاجات عبارة عن فيروسات تصيب الخلايا البكتيرية وتؤدي إلى موتها وتحللها. والفيروسات عموماً كائنات دقيقة جداً تعيش بداخل الخلايا الحية المصابة بها.

فإذا ما نمت مزرعة بكتيرية مع الفيروس الخاص بها على بيئة آجار مغذى فإن أهم مظهر لحدوث الإصابة بالفيروس هو ظهور مناطق رائقة (خالية من النمو البكتيري) تعرف بالبلكات (شكل ٣٣) وهذا نتيجة لإصابة الخلايا بهذه المناطق وتحللها كلية. وبالرغم من أن هناك عدد كبير من البكتيريات التي تصاب بالفيروسات الخاصة بها إلا أن أكثر البكتيريات دراسة من هذه الناحية هي البكتيرة *E. coli*. وتعرف الفيروسات التي تصيبها باسم Coli phages - وحيث أن هذه البكتيرة تعيش في الجزء السفلي من القناة الهضمية للإنسان فإنها توجد هي والفيروسات المحللة لها في مخلفات مجارى الصرف الصحي. وسوف نقوم في هذا التمرين بمحاولة عزل هذه الفيروسات من هذا المصدر. ويتطلب ذلك ثلاثة خطوات الأولى (إثراء البيئة بجزيئات الفيروس enrichment) الثانية عملية ترشيح filtration والثالثة عملية تنمية وزرع seeding. لاحظ أن عملية إثراء البيئة بأعداد كبيرة من جزيئات الفيروس تتم في بيئة خاصة قبل عملية الترشيح وفصل جزيئات الفيروس عن الخلايا البكتيرية.



شكل ٣٣ : ظهور المناطق الخالية من النمو البكتيري (plaques) يدل على حدوث العلاقة التحليلية lytic من الفاج والبكتيرة المختبرة.

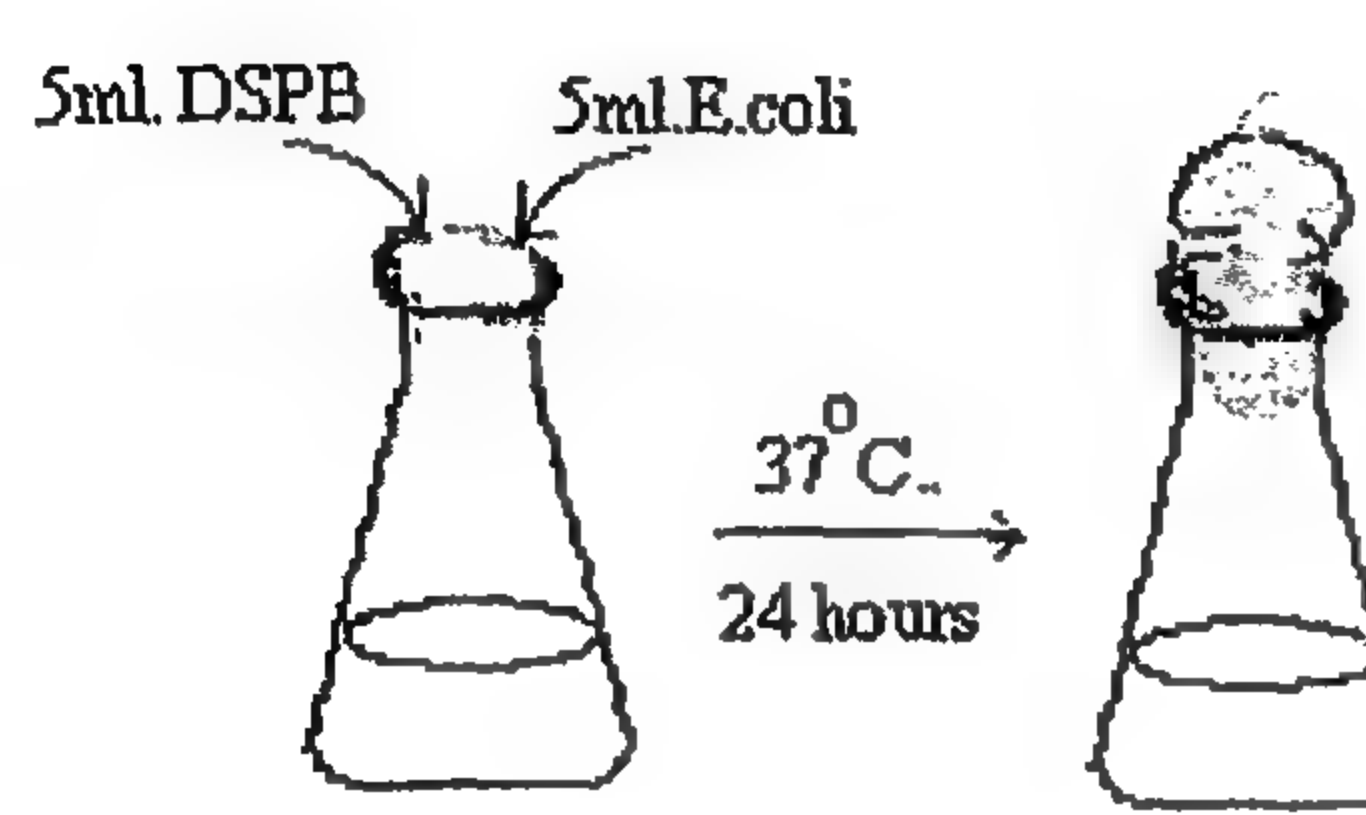
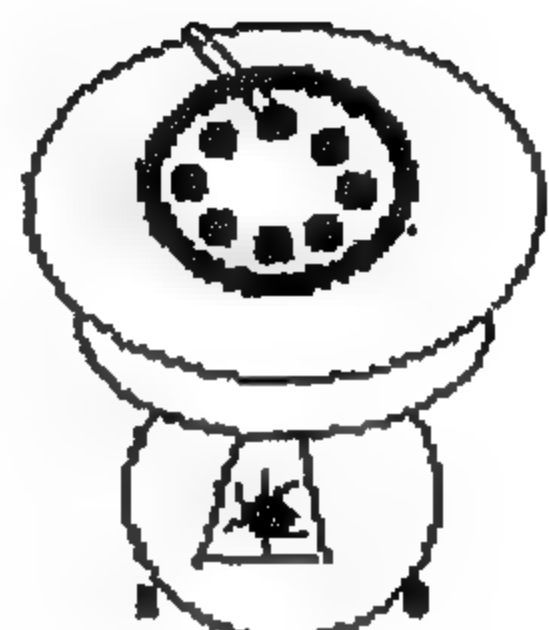
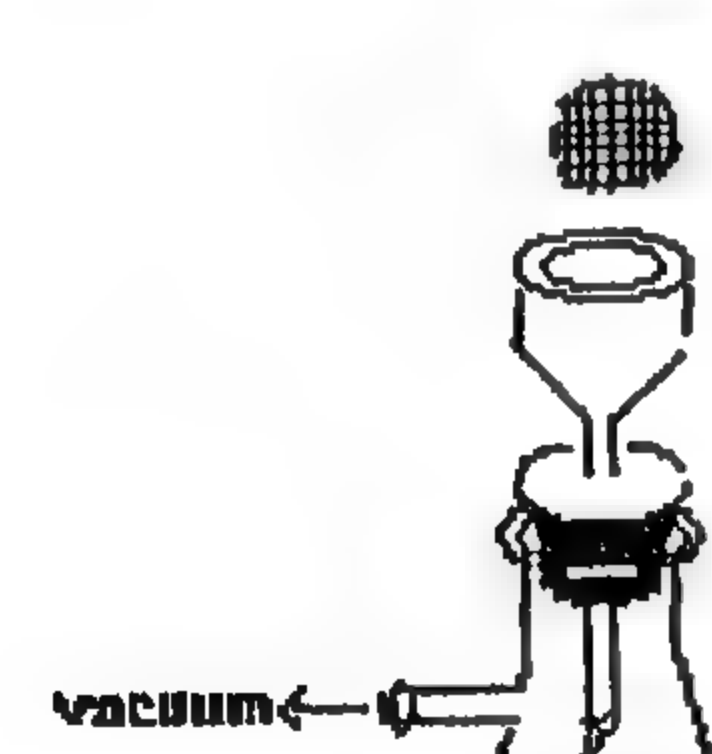
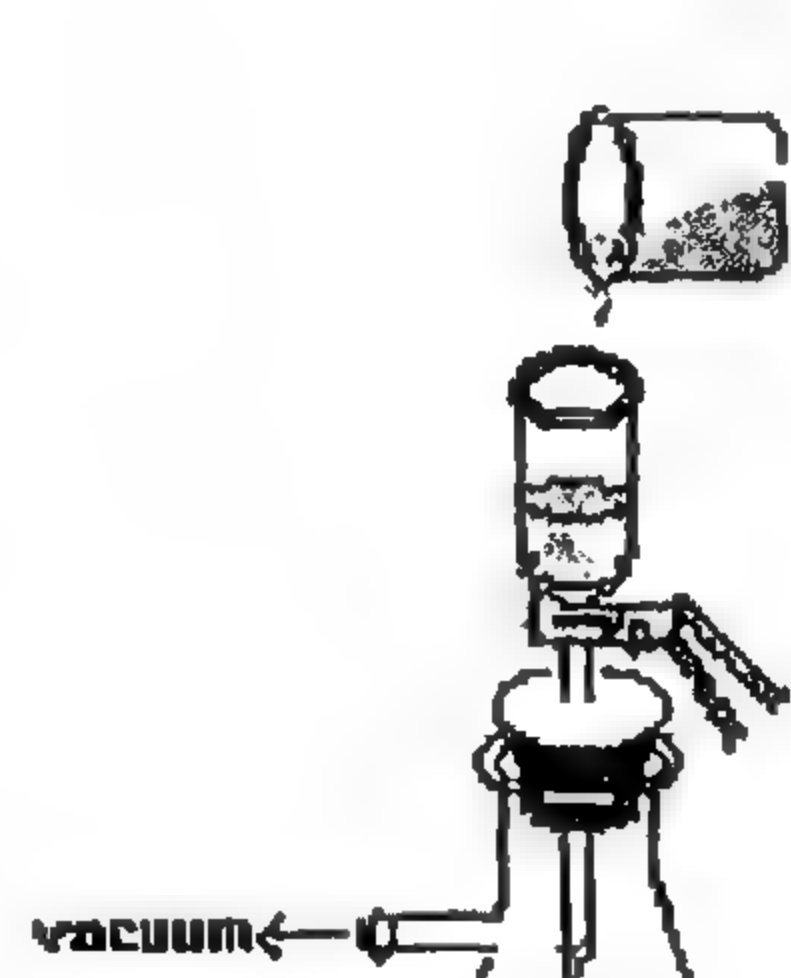

التمرين السادس و العشرون

- ١- عملية الإثراء enrichment : تتم بأخذ عينة ٤٥ مل من مياه المجارى ثم يضاف إليها ٥ مل من مزرعة *E. coli* نامية لمدة ٤٨ ساعة و ٥ جم من بيئة Decca Strength Phage Broth المجففه والجاهزه ويحضن المخلوط على درجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة (راجع ملحق البيئات بآخر الكتاب)
- ٢- عملية الترشيح: ولترشيح السريع للمخلوط بعد فترة الحضانة يجب معاملته أولاً بالقوة المركزية الطاردة ، ونلاحظ ضرورة إعادة عملية الطرد المركزى حيث يتم فصل معظم الخلايا وجدرها حتى لا تسد الغشاء المستعمل فيما بعد للترشيح ونلاحظ أن تكون سرعة الطرد المركزى ٢٥٠٠ لفة/دقيقة ويستعمل غشاء millipore filter معقم بالإستعانة بالجهاز الخاص به (شكل ٣٤) ويرشح فيه السائل الناتج من عملية الطرد المركزى بالإستعانة بالتفريغ الهوائى من خلال الغشاء الدقيق المستعمل وإذا حدث أن انسدت مسام الغشاء أثناء العمل يجب تغييره حيث من الضرورى اعداد مجموعة منه جاهزة أثناء العمل وهذه الأغشية المستعملة عادة يكون لها ثقب دقيقة جداً قطر كل منها مايقرب من ٤٥ , ميللى ميكرون أو nm أو أقل وهذه تمنع مرور الخلايا البكتيرية أو جدرها ويسمح فقط لجزيئات الفاج Phage virions بالمرور خلالها (شكل ٣٤) .

زراعة الفاج Seeding

وللتأكد من وجود كمية كافية من جزيئات الفاج فى الراشح الناتج يجب أن يختبر على مزرعة غزيرة النمو من كل من *E. coli* والفاج نفسه والبيئة المستعملة لذلك هى بيئة الآجار المغذى النصف صلبة Soft nutrient agar (مرق مغذى + ٢/١٪ آجار) وهذه البيئة عندما تتصلب تعطى قواماً جيلاتينياً يسمح

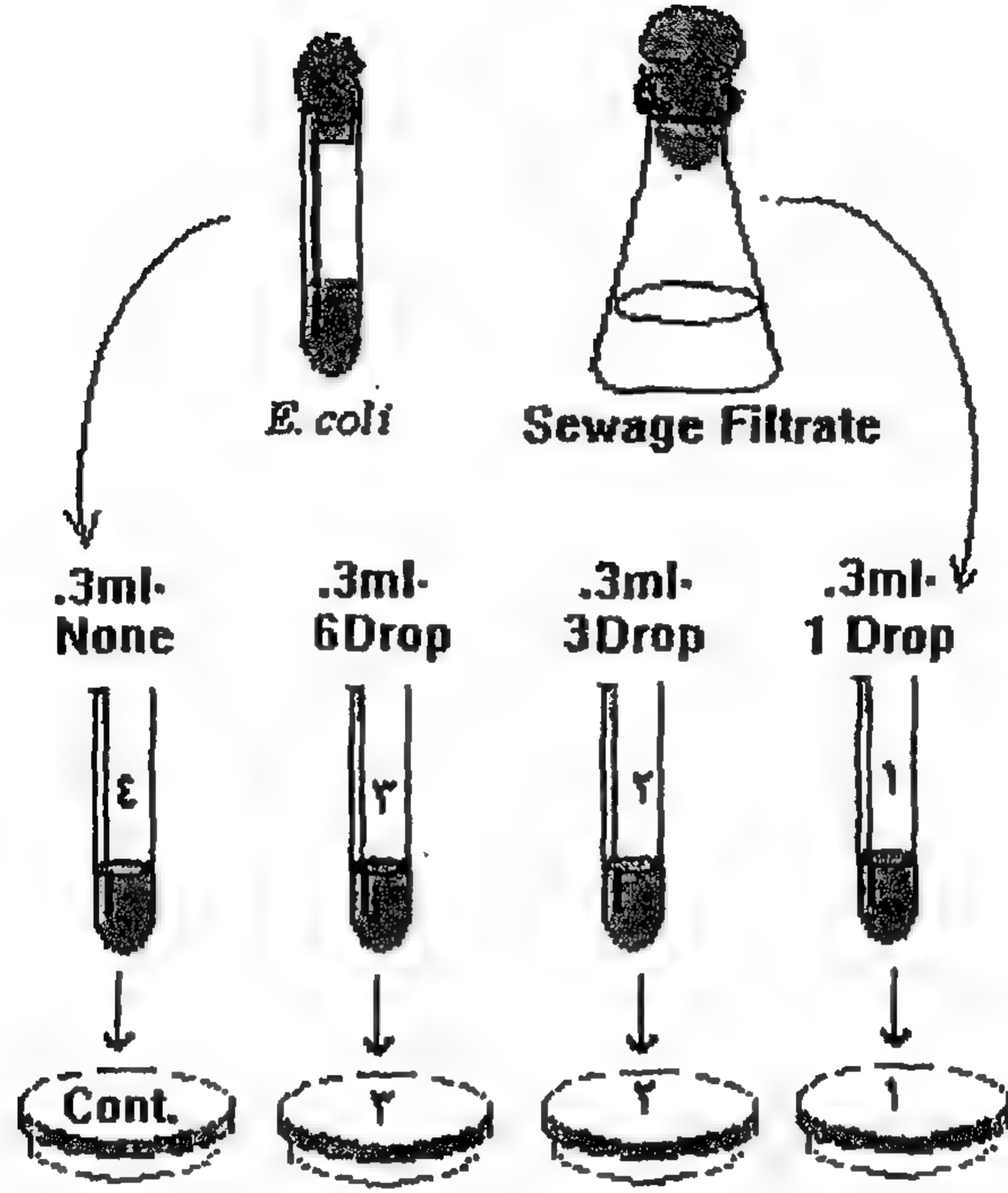
بتكوين المناطق الرائقة plaques بدرجة أفضل وطبقة الآجار الطرية هذه تصب فوق سطح بيئة آجار مغذى عادية ولأجراء ذلك تتبع الخطوات التالية:

 <p>5ml. DSPB 5ml. E.coli</p> <p>37°C. 24 hours</p> <p>إضافة ٥ مل من <i>E. coli</i> و ٥ مل من DSPB الى ٤٥ مل من مياة المجارى ويحضن المخلوط على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.</p>	 <p>تكرر عملية الطرد المركزي ٣ مرات على سرعة ٢٥٠٠ لفة / دقيقة.</p>	
 <p>يوضع غشاء المليونير في الجهاز الخاص به.</p>	 <p>يرشح السائل الناتج من الطرد المركزي.</p>	 <p>الحصول على الراشح المعقم في ورق معقم.</p>

شكل ٣٤ : يوضح عمليتي الإثراء و الترشيح للفاج.

التمرين السابع والعشرون

- أ- ضع أربعة أنابيب من الآجار المسال النصف صلب في كأس محتوى على نصفه ماء ثم أغلى الماء حتى ينصهر الآجار - أترك الأنابيب بالماء الساخن حتى يبرد إلى درجة ٥٠°م وضعها على سطح ساخن (شكل ٣٥) .
- ب - علم الأنابيب برقم ١، ٢، ٣، ٤ .
- ج - حضر أربعة أطباق معقمة وعلمها بنفس الأرقام ثم صب بها كمية من الآجار المغذى العادى المعقم وأتركها تتصلب (٢٪ آجار) .
- د - باستعمال ماصة معقمة سعة ١ ميليلتر أنقل نقطة من الراشح المعد سابقاً إلى الأنبوبة رقم ١ وثلاثة نقط من الأنبوبة رقم ٢ وستة نقط من الأنبوبة رقم ٣ وأترك الأنبوبة رقم ٤ دون إضافة .
- هـ - وباستعمال ماصة معقمة جديدة انقل ما يقرب من ٣ مل من مزرعة سائلة بعمر ٢٤ ساعة من *E. coli* إلى كل أنبوبة بما فيها الأنبوبة رقم ٤ .
- و- وبعد تمرير فوهة كل أنبوبة على اللهب أنقل محتوياتها بعد رجها جيداً إلى الأطباق المناظرة فوق الآجار المغذى المتصلب . مع تحريك كل طبق حتى ينتشر البيئة الطرية بانتظام على سطح الآجار المتصلب .
- ز- بعد أن تبرد الأطباق جيداً أنقلها إلى الحضان فى وضع مقلوب - ثم أفحص الأطباق كل ٦ ساعات للبحث عن المناطق الرائقة ثم قسها وقدر قطرها .



شكل ٣٥ : طريقة زراعة الفاج

- الأنابيب من ١ الى ٤ تحتوى على بيئة آجار نصف صلبه- تسال هذه البيئه وتحفظ فى حمام مائى على درجة حراره ٥٠° م .
- تصب الأنابيب النصف صلبة الملقحة على آجار مغذى فى الأطباق .
- تحضن الأطباق على ٣٧° م .

العوامل البيئية وتأثيرها على النمو البكتيري

يتأثر النمو البكتيري بالعوامل البيئية المختلفة في البيئات الطبيعية مما يكون له دور واضح في تأقلم ومعيشة هذه الكائنات .
وهذه العوامل قد تكون ذات طبيعة فيزيائية physical كالحرارة والضغط الأسموزي والحموضة والإشعاع والرطوبة والجفاف والتوتر السطحي والتهوية أو تكون ذات طبيعة كيميائية كتأثير الأيونات السامة والأصبغ أو المطهرات أو ذات طبيعة حيوية مثل تأثيرها بالكائنات الحية المضادة أو مما تفرزه من مضادات حيوية . أو مواد منشطة إلى آخره .
وفيما يلي بعض التمارين لإظهار الطرق القياسية للتعرف على تأثير هذه العوامل .

أولاً العوامل الفيزيائية

١- تأثير الحرارة:

تعتبر الحرارة أهم العوامل الفيزيائية تأثيراً على الأنشطة الإنزيمية البكتيرية وعلى نقيض الكائنات ذات الدم الساخن فإن البكتيريا لا تحتفظ بالحرارة الناتجة ولا تستغلها في تفاعلاتها الأيضية وعلى ذلك فإن نظمها الإنزيمية تعتمد على حرارة البيئة .

وللإنزيمات درجات حرارة مثالية optimum ودرجة حرارة دنيا minimum وأخرى قصوى maximum وهذه الدرجات من الحرارة مرتبطة أيضاً بالنمو البكتيري . فعند الدرجة المثالية يكون النمو وكذلك النشاط الإنزيمي على أشدهما أما عند الدرجة الدنيا فتعتبر أقل درجة من الحرارة ينمو عليها النوع البكتيري وأى إنخفاض عنها يوقف النمو . وكذلك الدرجة القصوى فهي أعلى

درجة حرارة يمكن عندها إستمرار النمو وإذا ارتفعت عن ذلك يتوقف النمو وربما تموت الخلية .

أ- تحديد المجال الحرارى للنمو:

ويعتبر تقدير هذه الدرجات الثلاثة لكل نوع بكتيرى من التقديرات الهامة والمفيدة فى أغراض التعرف والتصنيف وعن طريقها أمكن تقسيم البكتيريات إلى ثلاث مجاميع :

١- مجموعة محبة للحرارة المرتفعة Thermophilic

٢- مجموعة محبة للحرارة المتوسطة Mesophilic

٣- مجموعة محبة للحرارة المنخفضة Psycrophilic

وفيما يلى خطوات تقدير الدرجة المثالية لبعض البكتيريات :

التمرين الثامن والعشرون

١- لقح أنابيب اجار مغذى مائل مرقمه ١، ٢، ٣ بكميات من كل مما يأتى:

رقم ١- *E. coli* أربعة أنابيب ورقم ٢- *Bacillus subtilis* أربعة أنابيب ورقم ٣- *Bacillus staerothermophilus* أربعة أنابيب .

٢- قسم الأنابيب إلى أربعة مجاميع كل مجموعة ٣ أنابيب أنبوبة لكل

نوع بكتيرى .

٣- ضع مجموعة فى حضان على درجة ٥٥°م والأخرى بحضان على

درجة ٣٧°م والثالثة بحضان على درجة حرارة الغرفة والرابعة فى حضان على درجة ٥°م . وأتركها لمدة ٢٤ ساعة .

٤- افحص المزارع الناتجة فى أنابيب كل مجموعة ودون ملاحظائك

عن وجود نمو من عدمه .

ب - التأثيرات المميتة للحرارة Lethal effect of temperature

يتبع لذلك طريقتين :

الأولى تقدير الدرجة المميتة من الحرارة (TDP) Death Thermal Point وهو درجة الحرارة المميتة لخلايا البكتيريا عندما تعرض لها لمدة ١٠ دقائق .

والثانية تقدير الوقت الحرارى المميت (TDT) Thermal Death Time والأخير هو الوقت اللازم لقتل محتويات معلق من الخلايا الخضرية أو الجراثيم عند درجة حرارة معينة .

وحيث أنه لا تموت كل الخلايا فى وقت واحد على درجة الحرارة المستعملة فى التقدير الأول (TDP) أو بعد التعرض لفترة معينة على درجة حرارة ثابتة فى التقدير الثانى (TDT) فإن هذين التقديرين ليسا بالتقديرات الدقيقة حيث يتدخل فى عملية الموت هذه عوامل أخرى مثل درجة تركيز أيون الأيدروجين بالمزرعة وكثافة المعلق البكتيرى المستعمل .

لذلك فيستعاض عن هذين التقديرين بتقدير آخر يعرف بمعدل الوقت الحرارى (TDR) Thermal Death Rate وهو أقل عدد من الخلايا الحية الذى يوجد بالمعلق أو المزرعة عند تعرضها لدرجة حرارة معينة لمدة ١٠ دقائق وفيما يلى خطوات إجراء هذا التقدير :

التمرين التاسع والعشرون

- ١- ضع ١ مل من مزرعة البكتيريا *E. coli* نامية لمدة ٢٤ ساعة فى كل من ٥ أنابيب اختبار معقمة وفارغة .
- ٢- جهز حمام مائى وعلى درجة ٤٥°م ثم ضع به أحد الأنابيب وأتركها لمدة ١٠ دقائق ثم صب محتوياتها فى طبق بترى معقم .

- ٣- أرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٥٠°م ثم ضع بها أحد الأنابيب الأربعة الباقية لمدة ١٠ دقائق ثم أفرغ محتوياتها فى طبق بترى معقم .
- ٤- أرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٥٥°م وضع فيه أحد الأنابيب الثلاث المتبقية لمدة ١٠ دقائق ثم أفرغ محتوياتها فى طبق بترى معقم .
- ٥- أرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٦٠°م وضع به أحد الأنبوبتين المتبقيتين وأتركها لمدة ١٠ دقائق ثم أفرغ محتوياتها فى طبق بترى معقم .
- ٦- أفرغ محتويات الأنبوبة المتبقية فى طبق بترى معقم دون تعريضها إلى أى معاملة حرارية .
- ٧- صب فوق الأطباق كميات متساوية من بيئة الآجار المغذى المسالة على درجة ٤٥°م ثم أخلط البيئة مع اللقاح بحركة رحوية .
- ٨- عقب تصلب الآجار ضع الأطباق بالحضان ٣٧°م بعد كتابة البيانات اللازمة على الأطباق وأتركها ٤٨ ساعة .
- ٩- قدر عدد المستعمرات الناتجة من كل طبق وقارن النتائج .

الضغط الأسموزى والنمو البكتيرى

Osmotic pressure and Bacterial growth

يتأثر النمو البكتيرى بدرجة كبيرة بكمية الماء الخارجة والداخلية إلى الخلية . فعندما يكون الوسط خارج الخلية ذو ملوحة منخفضة hypotonic أى ينخفض فيه تركيز الأملاح عن تركيز السيتوبلازم الخلوئ نفسه فينشأ ضغط أسموزى مرتفع بداخل هذه الخلية ، وبإستثناء بعض بكتيرات المياه المالحة فى البحار والمحيطات فإن هذا التأثير يكون ضار بالخلية هذا والجدار الخلوئ البكتيرى جدار صلب وقوى وعند الإنتفاخ الطفيف للخلايا نتيجة وجودها فى

محلول مخفف من الأملاح لا يتأثر هذا الجدار وتعرف الخلية حينئذ بأنها في حالة انتفاخ Swelling ، والعملية تعرف Plasmolysis وإذا زاد الانتفاخ قد تتفجر الخلايا وتموت .

وإذا عكس الوضع ووجدت الخلية في وسط مرتفع في تركيزه من الأملاح (hypertonic) فإن النمو يتوقف تماماً . ويرجع ذلك إلى خروج الماء من سيتوبلازم الخلية بمعنى أنه يحدث تجفيف للسيتوبلازم وينكمش البروتوبلازم بداخل الخلية بعيداً عن النواه ويقال لمثل هذه الخلايا بأنها في حالة بلزمة plasmolysis ويمكن لها أن تسترد ما فقدته من ماء إذا ما وضعت في محلول متزن من الأملاح isotonic بمعنى أن هذا التأثير يمكن الرجوع فيه إذا ما أزيل العامل المؤثر .

وبخلاف الخلايا النباتية والحيوانية فإن البكتيريا ليست حساسة للتغيرات البسيطة في درجة الضغط الأسموزي. للبيئة النامية عليها ولكن إذا زادت هذه التغيرات بدرجة كبيرة أثر ذلك على الخلايا البكتيرية . وتختلف البكتيريا في درجة تحملها للضغوط الأسموزية المرتفعة، الأمر الذي أدى إلى تقسيمها إلى بكتيريا محبة للملوحة المرتفعة Halophilic وأخرى غير محبة للملوحة المرتفعة Nonhalophilic .

ويجب أن نذكر هنا أن بعض الدراسات البكتيريولوجية قد تتطلب استعمال خلايا مبلزمة كما يحدث عند صبغ ودراسة الغشاء السيتوبلازمي للخلايا البكتيرية ، وفيما يلي خطوات إجراء تمرينان يبينان أثر الضغط الأسموزي:

التمرين الثلاثون (أ)

- ١- خطط أربعة أطباق بترى بها بيئة محتوية على تركيزات مختلفة من ملح الطعام بثلاث بكتيريات مختلفة فى درجة تحملها للملوحة ، والبكتيريات هي: *Staphylococcus aureus* و *E. coli* و *Halobacterium halobium* والطبق الأول يحتوى على بيئة بها ٥ ٪ كلوريد صوديوم
الطبق الثانى يحتوى على بيئة بها ٥ ٪ كلوريد صوديوم
الطبق الثالث يحتوى على بيئة بها ١٠ ٪ كلوريد صوديوم
الطبق الرابع يحتوى على بيئة بها ١٥ ٪ كلوريد صوديوم
- ٢- ضع الأطباق الملقحة بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة ثم دون نتائجك عن حدوث النمو على خطوط التلقيح من عدمه .

التمرين الثلاثون (ب)

- ١- ضع كمية ١ مل من محلول سكر القصب (السكروز) ٤٠ ٪ فى كل من أنبوبتين معقمتين وفارغتين .
- ٢- أضف كمية ١ مل من محلول السكروز ٤٠ ٪ إلى ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى كل من الأنبوبتين ليصبح تركيز السكر بهما ٤ ٪ .
- ٣- كرر العملية ولكن بوضع ١ مل من محلول سكر السكروز ٤ ٪ إلى ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى كل من أنبوبتين أخريتين ليصبح تركيز السكر بهما ٠,٤ ٪ .
- ٤- كرر نفس الخطوات الثلاث السابقة باستعمال محلول كلوريد الصوديوم ٢٧ ٪ لتحضير مجموعتين من التركيزات المتسلسلة تبدأ من ٢٧ ٪ ثم ٢٠,٧ ٪ وينتهى ٢٧ ٪ .

٥- صب في ستة أطباق بترى بها بيئة آجار مغذى مسال ومبرد لدرجة ٥°م ثم أتركه ليتصلب.

٦- أقلب الأطباق وقسم قاعدتها إلى ٦ أقسام بواسطة قلم شمع.

٧- ضع الأنابيب الست السابق تجهيزها مرتبة تبعاً لتركيزاتها ثم لقح أنابيب مجموعة واحدة من مجاميع السكروز أو ملح الطعام بمزرعة من البكتيره *E. coli* بعمر ٢٤ ساعة، ثم لقح أنابيب المجموعتين الأخرتين بمزرعة من البكتيره *Bacillus subtilis* بعمر ٧٢ ساعة.

٨- لقح كل جزء من أجزاء أحد أطباق بترى المعلمة مباشرة بعد الخلط بلقاح كل أنبوبة المكونة لكل مجموعة.

٩- كرر نفس العمليات بعد مرور ساعة على وضع الخلايا في المحاليل السكرية والملحية.

١٠- كرر نفس الخطوات السابقة ولكن بعد مرور ٢٤ ساعة من خلط الخلايا في المحاليل السكرية والملحية.

١١- دون النتائج في جدولين جدول خاص بالمحاليل السكرية، والآخر بالمحاليل الملحية.

٢- تأثير تركيز أيون الأيدروجين Effect of ion concentration

يأتى درجة تركيز أيون الأيدروجين فى البيئة فى المرتبة الثانية بعد الحرارة فى تأثيره على النمو البكتيرى.

وتركيز أيون الأيدروجين الذى عادة يعبر عنه بدرجة pH ($\log 1/H +$) يؤثر على نشاط الإنزيمات التى تؤدى جميع وظائف الخلية النباتية وغير النباتية.

يتأثر النمو البكتيرى بدرجة كبيرة بالتغيرات فى تركيز أيون الأيدروجين بالبيئة النامى عليها، وكما هو الحال من ناحية المتطلبات الحرارية، فإن لكل نوع بكتيرى درجة مثالية Optimum من تركيز أيون الأيدروجين يكون النمو

عندها أكبر ما يمكن، كما أن له درجة عظمى Maximum وهي أقصى درجة يحدث عندها نمو، وأن أى زيادة فى تركيز أيونات الأيدروجين عن هذه الدرجة تمنع النمو .

وكذلك نجد أيضاً أن لكل نوع بكتيرى درجة دنيا Minimum ، وهي الدرجة التى إذا انخفض عنها تركيز أيون الأيدروجين يتوقف النمو كلية، ويجب أن نعلم أن هذه الدرجات الثلاث من تركيز أيون الأيدروجين والخاصة بكل نوع بكتيرى ليست ثابتة بل تتأثر كثيراً بعوامل عديدة منها، درجة الحرارة وتركيب البيئة، والضغط الأسموزى وعموماً فإن البكتيرات فيما عدا عدد قليل منها تتطلب تركيز متوسط من أيون الأيدروجين بمعنى أنها تتطلب بيئات متعادلة .
وفيما يلى خطوات تمرينان للتعرف على تأثير الـ pH :

التمرين الواحد والثلاثون (أ)

- ١- حضر المحاليل الآتية محلول ٢ ، ٠ جزيئى من فوسفات ثنائى البوتاسيوم ومحلول ١ ، ٠ جزيئى من حمض الستريك ومحلول ٢ ، ٠ جزيئى حمض بوريك ومحلول ٢ ، ٠ جزيئى صودا كاوية .
- ٢- جهز مجموعة من المحاليل المختلفة فى قيمة الـ pH وذلك بخلط كميات من المحاليل السابقة طبقاً للنظام المبين بالجدول (٦) .
- ٣- عقم الأنابيب المحتوية المختلفة فى درجة الـ pH فى معقم أرنولد بطريقة التعقيم المتقطع .

٤- لقح كل أنبوبة بلقاح من مزرعة *E. coli* عمرها ٢٤ ساعة .

٥- ضعها فى حضان (٣٧°م) لمدة ٤٨ ساعة .

٦- لاحظ النمو بتقدير كمية التعكير التى تحدث بالبيئة دون رجها .

٧- دون ملاحظاتك فى جدول مبيناً درجة التعكير مستعيناً بالقياسات

+ = عكارة خفيفة

+++ = عكارة شديدة

التالية: - = لا يوجد عكارة

++ = عكارة متوسطة

(جدول ٦) : طريقة تحضير بيئات زرع متدرجة في تركيز أيون الإيدروجين .

فوسفات ثنائي البوتاسيوم ٢, جزيئي (سم ^٣)	حمض الستريك ١, جزيئي (سم ^٣)	بيئة مرق مغذي (سم ^٣)	الحجم الكلي (سم ^٣)	قيمة الـ pH بالتقريب
٠,٣	١,٧	٨	١٠	٢,٨
٠,٦	١,٤	٨	١٠	٣,٦
٠,٩	١,١	٨	١٠	٤,٤
١,١	٠,٩	٨	١٠	٥,٢
١,٣	٠,٧	٨	١٠	٦,٠
١,٥	٠,٥	٨	١٠	٦,٨
١,٩	٠,١	٨	١٠	٧,٦
حمض بوريك ٢, جزيئي (سم ^٣)	صودا كاوية ٢, جزيئي (سم ^٣)	بيئة مرق مغذي (سم ^٣)	الحجم الكلي (سم ^٣)	قيمة الـ pH بالتقريب
١,٧	٠,٣	٨	١٠	٨,٤
١,٣	٠,٧	٨	١٠	٩,٢
١,٠	١,٠	٨	١٠	١٠,٠

التمرين الواحد والثلاثون (ب)

- ١- جهاز تسعة أنابيب مرق مغذى كل ثلاثة منها تختلف فى قيمة الـ pH
ثلاثة ذات رقم (١) pH 5.0 ، ثلاثة رقم (٢) pH 7.0 ، وثلاثة رقم (٣) pH 9.0 .
- ٢- لقح الثلاث أنابيب ذات الـ pH الواحد بكل من ثلاثة بكتيريات هى
مزارع مرق مغذى *E.coli* , *Staphylococcus aureus* , *Sporosarcina ureae* .
- ٣- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٧٢ ساعة .
- ٤- قدر درجة العكارة فى الأنابيب المختلفة بالعين المجردة .

٣- تقدير الإحتياجات الأوكسوجينية

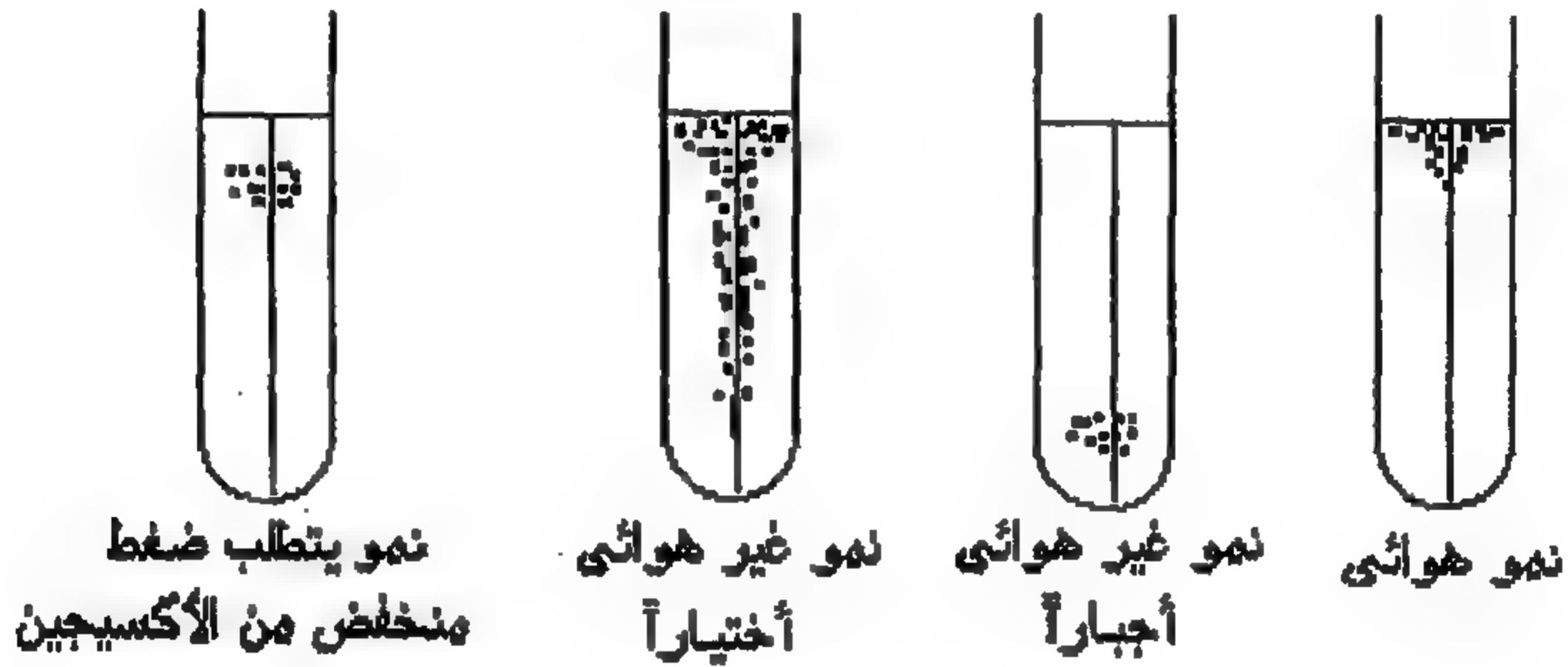
تختلف البكتيريات فى حاجتها من الأكسجين من حيث هوائية إجباراً
Strict aerobes وهى التى لا تنمو فى غياب الأكسجين ، وغير الهوائية
إجباراً Strict anaerobes وهى التى لا تنمو فى وجود الهواء وبين هذين
النقيضين توجد مجاميع إختيارية Facultative وهى التى يمكن لنظمها الإنزيمية
أن تعمل فى وجود الأكسجين أو فى غيابه بشرط وجود مواد تستعمل كمصدر
للأكسجين مثل النيترات مثلاً فهى تكيف نفسها حسب الظروف ومجموعة أخرى
غير مكرسة بالأكسجين indifferent فهى التى تنمو بنفس الكفاءة سواء وجد
الأكسجين أم لم يوجد وهذه تعرف بالكائنات غير الهوائية إختياراً Facultative
anaerobes ، ومجموعة رابعة تحتاج الأكسجين بتركيز منخفض جداً وتعرف
microaerophilic ، وللتعرف على البكتيريات المجهولة يجب أن تعلم إلى أى
مجموعة ينتمى الميكروب المجهول .

وهناك عدة طرق لإختبار مدى حاجة الكائنات البكتيرية من الأكسجين
وقد تفيد بعض من هذه الطرق أيضاً فى عزل الكائنات غير الهوائية فى مزارع
نقية . وفيما يلى وصفاً لطريقتين منها:

(أ) طريقة الآجار العميق:

التمرين الثانى والثلاثون

- ١- إغمس إبرة تلقيح مستقيمة معقمة فى معلق مائى لتربة زراعية .
- ٢- أؤخر بها بيئة آجار الجلوكوز العميق، سبق إسالتها وتصلبها وذلك لطردها ما قد يكون مختلطاً بها من هواء .
- ٣- ضع الأنابيب بالحضان (٣٧°م) لمدة ٤٨ ساعة ثم أفحص الأنابيب ولاحظ النمو البكتيرى الناتج على طول خط الوخر مستعيناً بالحالات المبينة بشكل ٣٦ .



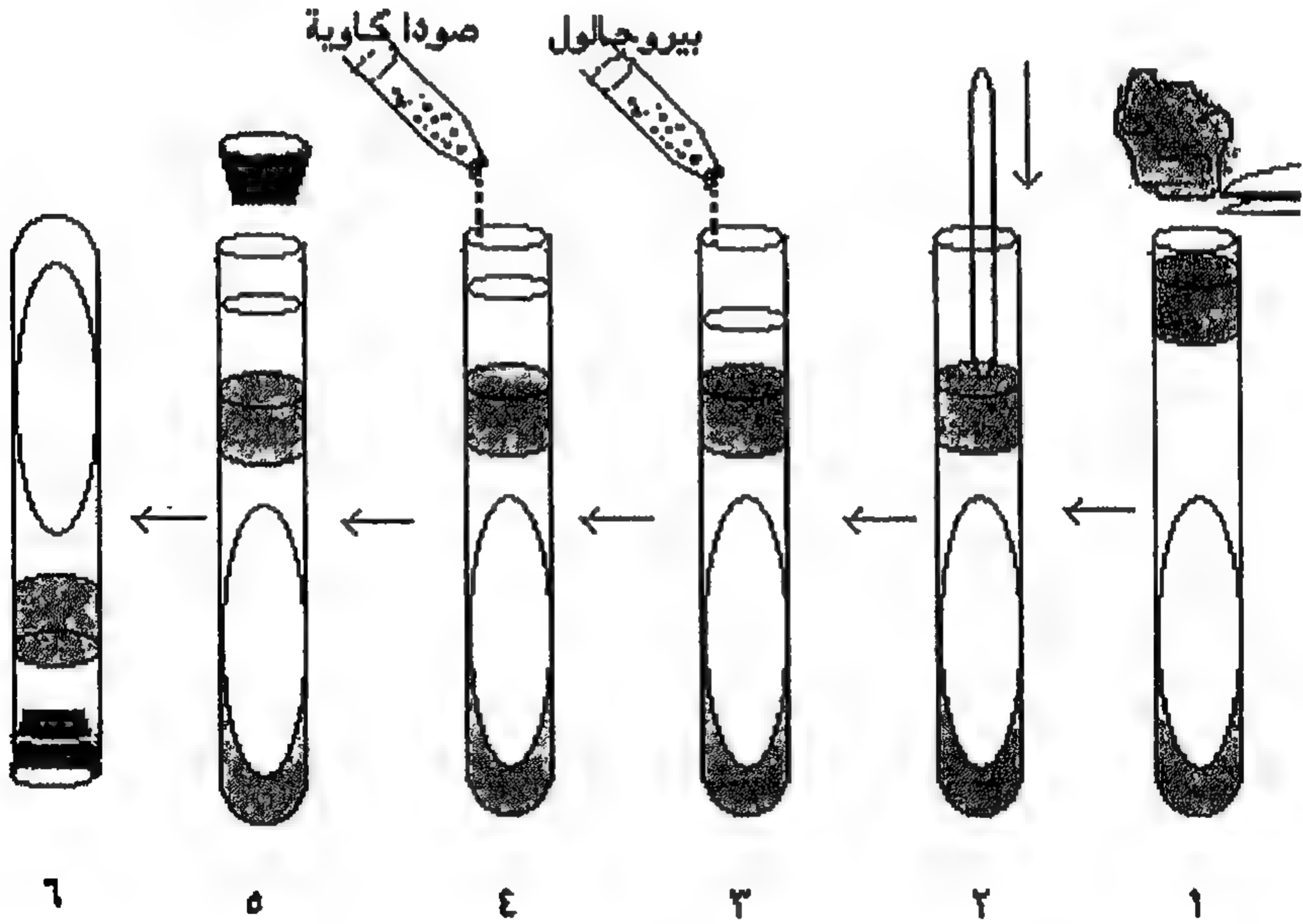
شكل ٣٦ : الحالات المختلفة لنمو البكتيريات بالآجار العميق .

(ب) طريقة أنبوبة رايت Wright tube method

لتنمية بكتيره غير هوائية على آجار مائل فإن الباحث يمكنه توفير جواً خالياً من الأكسجين بداخل الأنبوبة بالإستعانة بتفاعل كيماوى بين البيروجالول والصودا الكاوية . والمادة الأولى تعتبر مادة إختزالية قوية تزيل الأكسجين من الأنبوبة .

التمرين الثالث والثلاثون

- (١) لقح ثلاثة أنابيب آجار جلوكوز مائل واحدة بكل بكتيره من البكتيرات الآتى ذكرها *Clostridium sporogenes* , *Bac. subtilis* , *Clostridium rubrum* , *Control* ، أو بمعلق التربة الزراعية السابق استعماله أو بالنمو غير الهوائى الناتج فى قاع أنبوبة الآجار العميق .
- (٢) جهاز الأنابيب الأربعة حسب ما هو مبين فى شكل ٣٧ فى الخطوة ١ يجب أن تقص السدادة القطنية بواسطة مقص وما يتبقى منها بداخل الأنبوبة يدخل بالضغط بظهر إبرة التلقيح داخل الأنبوبة بمساحة ٤/١ بوصة من الآجار المائل الملقح وكذلك الخاص بالمقارنة ١ .



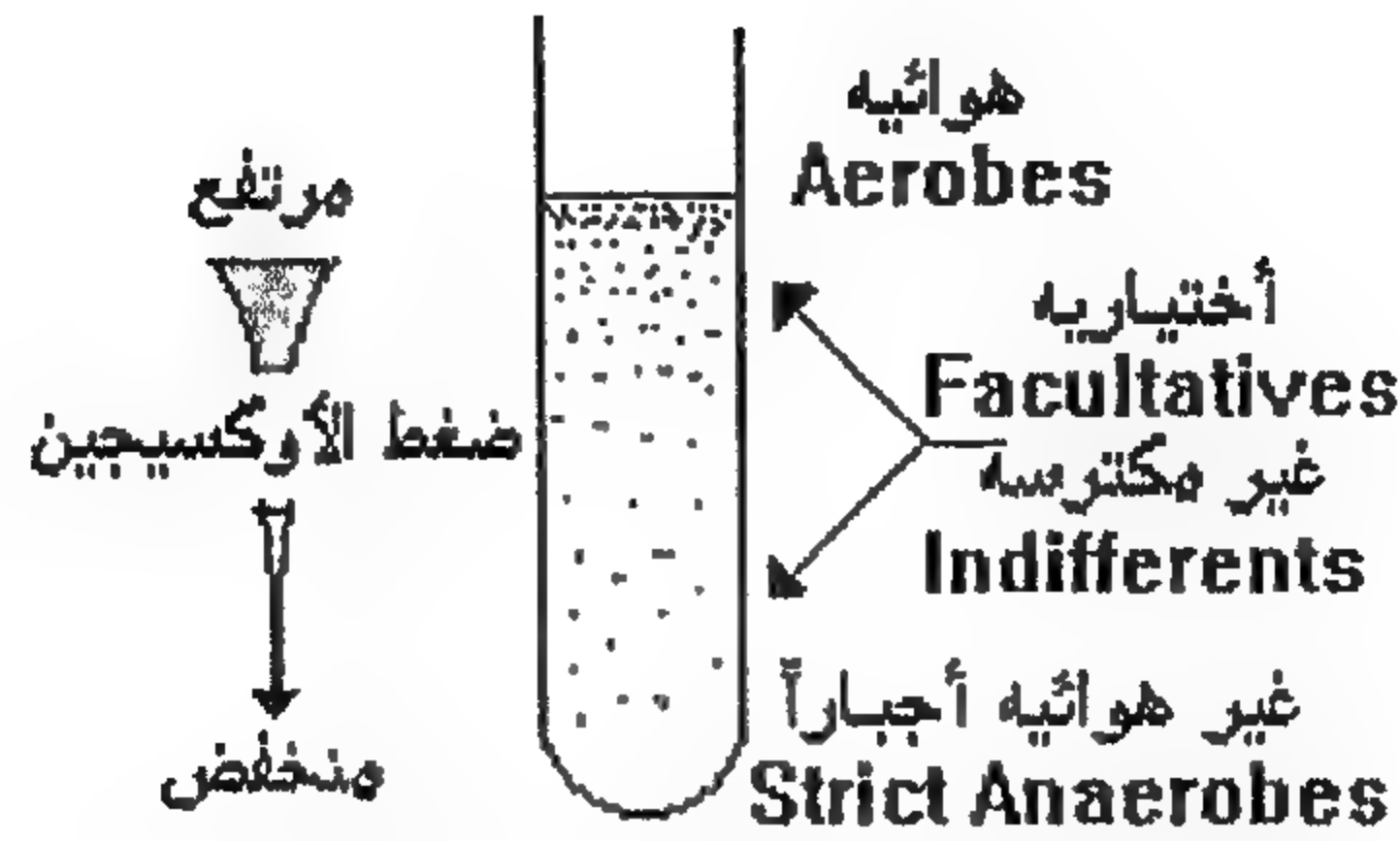
شكل ٣٧: طريقة تحضير أنبوبة رايت .

- (٣) يوضع كمية من البيروجالول ثم يضاف إليه كمية من الصودا الكاوية ثم تقفل الأنبوبة بسدادة فليينية أو مطاطية غلقاً جيداً ثم تقلب الأنبوبة بسرعة لمنع تسرب سوائل التفاعل إلى المزرعة.
- (٤) توضع الأنابيب بالحضان مقلوبة على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.
- (٥) قارن بين النموات بكل أنبوبة ودون ما تراه.

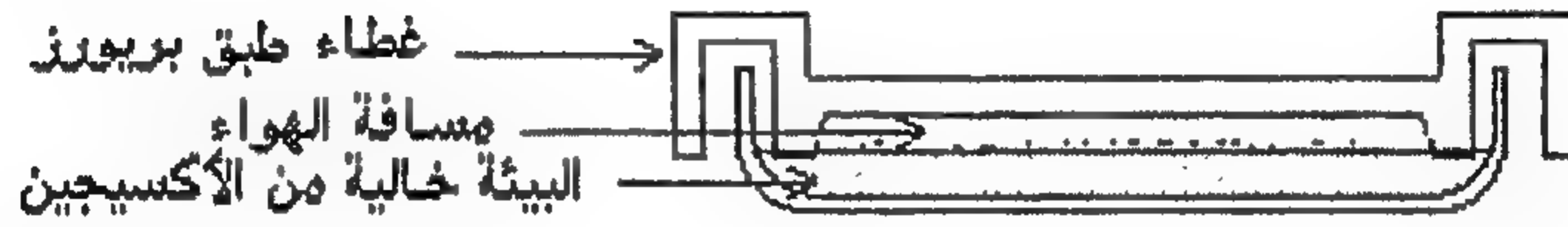
(ج) طريقة بيئة مرق Thioglycolate

التمرين الرابع والثلاثون

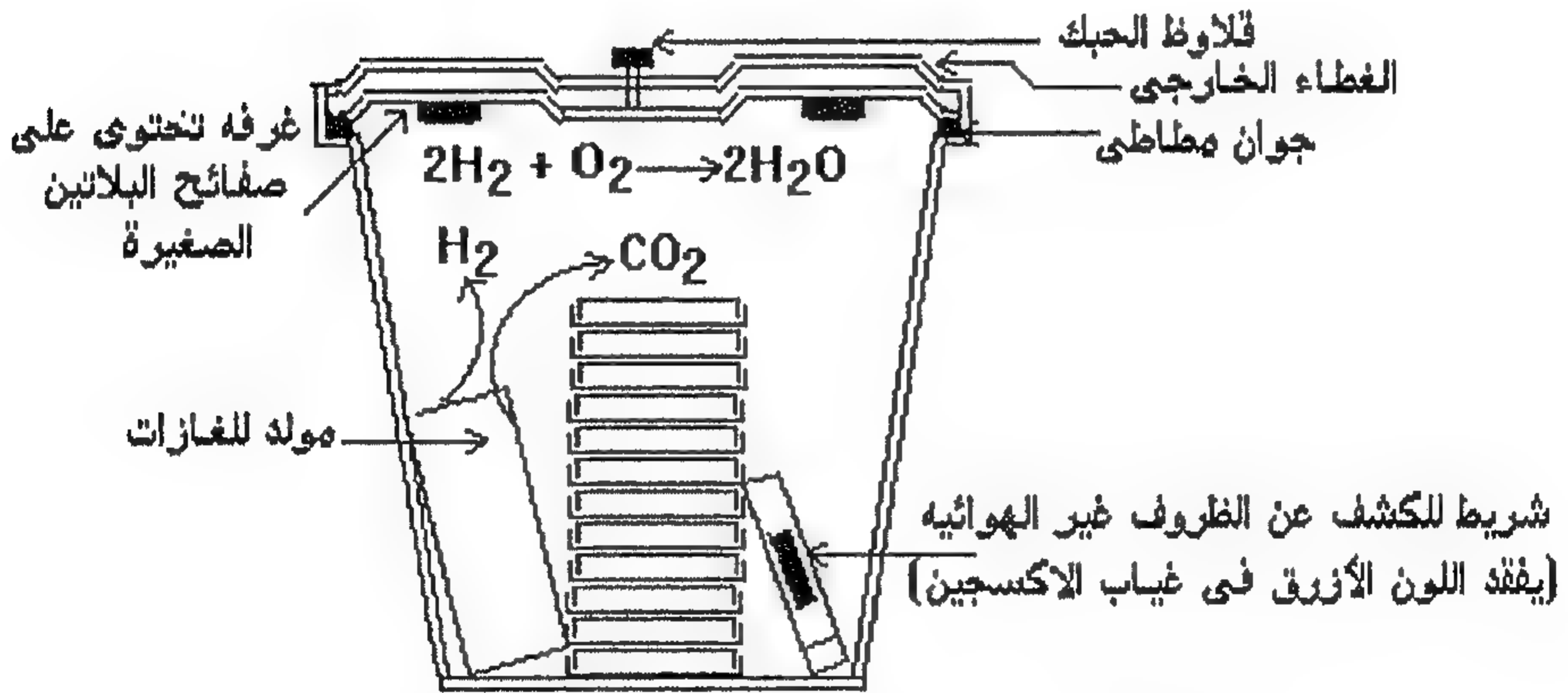
ويستعمل بيئة مرق thioglycolate لتقدير نوعية الميكروب المجهول فيما يختص بحاجته للأكسجين وهذه البيئة تحتوى على جلوكوز ، سيستين ، وثيوجليكولات الصوديوم لتقلل من كفاءتها التأكسدية الإختزالية كما تحتوى على صبغة resazurin لتكشف عن وجود الأكسجين ففي وجوده تتخذ الصبغة اللون الوردى وحيث أن وجود الأكسجين بكثرة بالقرب من سطح البيئة فهي تتخذ اللون الوردى عن سطحها وعديمة اللون فى الوسط وفى القاع ويضاف الآجار إلى البيئة لتثبيت النمو ويزيد من عدم تهوية قاع الأنبوبة (شكل ٣٨) وهناك طرق أخرى لتنمية البكتيريات غير الهوائية مبينة بالأشكال التالية شكل ٣٨ أ ، شكل ٣٨ ب ، شكل ٣٨ جـ .



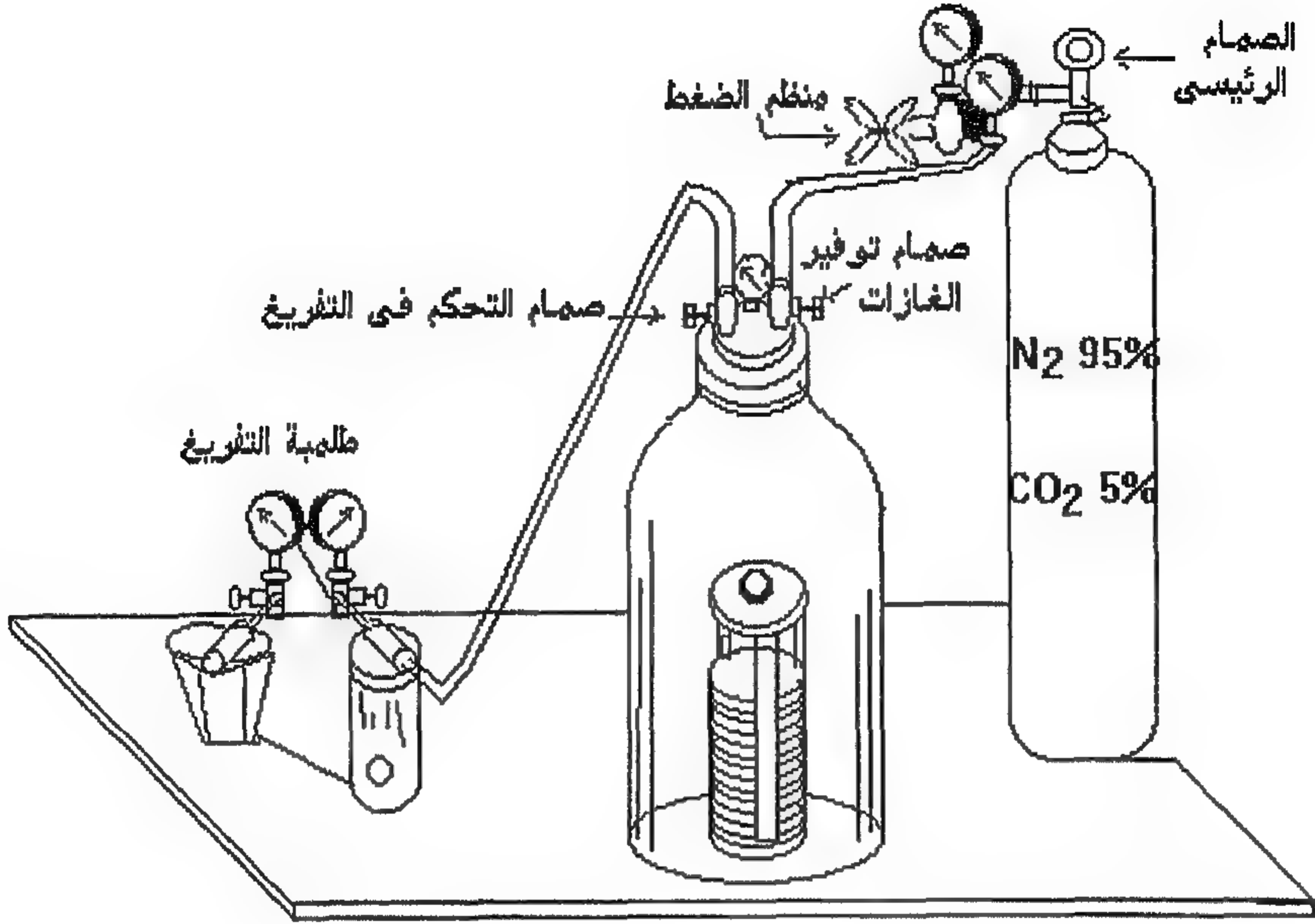
شكل ٣٨ طريقة بيئة ثيوجليكولات



شكل ٣٨ أ : طبق بريورز : المسافة المحصورة تشمل هواء خالي من الأكسجين
نتيجة لفعل الثيوجليكولات المحتوى عليها الأجار .



شكل ٣٨ ب : يبين The Gas Pak system



شكل ٣٨ ج : أجهزة توفير التفريغ والغازات في غرفة التنمية.

٤- تأثير الإشعاع:

بعض الإشعاعات مثل الأشعة فوق البنفسجية وأشعة جاما والأشعة الجزيئية (الناتجة عن الإلكترونات موجبة الحركة) وغيرها من الإشعاعات، لها تأثير ضار ومميت للبكتيريات. ولعل الأشعة فوق البنفسجية والأشعة السينية هي أكثر الإشعاعات دراسة في هذا الصدد، فالأشعة فوق البنفسجية مثلاً ليست سامة فقط لخلايا البكتيريات بل انها تعمل أيضاً على تكوين مواد سامة في بيئات الزرع الملقحة أو غير الملقحة عندما تعرض لها هذه البيئات. والتمرين التالي يبين تأثير هذا النوع من الأشعة على مزارع البكتيريات. فقد يكون التأثير مميت للخلايا البكتيرية نفسها أو نتيجة لفعل الأشعة على بيئة الزرع أو بكلا الطرفين.

التمرين الخامس والثلاثون

- ١- لقح أنبوبتين من الآجار المغذى المسال والمبرد على درجة ٤٥°م أحدهما بالبكتيريا *E. coli* (ملء عقدة من مزرعة بعمر ٢٤ ساعة) ، والأخرى بالبكتيريا *Bacillus subtilis* (ملء عقدة من مزرعة بعمر ٧٢ ساعة) اخلط اللقاح جيداً بالآجار بكل أنبوبة .
 - ٢- صب محتويات كل من الأنبوبتين في طبق بترى معقم وأتركها لتتصلب .
 - ٣- أحضر قطعتين من الورق الأسود وأقطع بها شكلاً معيناً وليكن أول حرف من اسمك .
 - ٤- أرفع غطاء كل من الطبقين وغطى الطبق بقطعة من الورق الأسود جيداً مع إحكام التغطية برباط من الخيط . (يرفع الغطاء لأن الزجاج يمنع مرور الأشعة فوق البنفسجية) .
 - ٥- عرض الأطباق لمصباح يشع موجات الأشعة فوق البنفسجية لمدة ٢/١ ساعة .
 - ٦- بعد مرور الوقت اللازم ارفع الورق الأسود وأعد للأطباق أغطيها الزجاجية ثم ضعها بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .
 - ٧- قارن عدد المستعمرات في المناطق المعرضة للضوء وتلك التي لم تعرض ودون نتائجك .
- ملحوظة:** لا تنتظر مباشرة في الأشعة فوق البنفسجية لتأثيرها الضار على النظر ويجب ارتداء نظارة تقي العين أو نظارة تقي الوجه بأكمله من تأثير الأشعة الضار .

ويمكن تعريض بيئة غير ملقحة بعد تغطيتها بقطعة من الورق الأسود ذات الأشكال المعينة ثم تلقح بعد ذلك بالبكتيريا وتحضن للتعرف على تأثير الأشعة على البيئة نفسها في المناطق المعرضة.

هـ- تأثير الجفاف The effect of desiccation

لا يمكن للكائنات الحية الدقيقة أن تواصل نموها وتكاثرها تحت ظروف الجفاف الشديدة. وخلايا البكتيريا كما سبق أن ذكرنا شأنها شأن الخلايا النباتية يجب أن تحصل على غذائها في صورة ذائبة في الماء إذ يشترط إذن لنموها أن تتوفر لها الرطوبة بدرجة كافية. وعندما تجف البيئة وما تحتويها من الخلايا نفسها على ضغط الجو العادي، فإن ذلك يدعو إلى توقف النمو الذي يعقبه الموت. ومعدل موت الخلايا نتيجة للجفاف قد يتأثر تبعاً لتغير بعض العوامل الأخرى. فمثلاً إذا تم تجفيف الخلية عن طريق تجميدها في جو مفرغ من الهواء فإن ذلك من شأنه حماية الخلية من الموت، وإذا استمرت ظروف التفريغ هذه لمدة طويلة فإن ذلك يؤدي إلى إحتفاظ بعض الخلايا المعاملة بهذه الطريقة بحيويتها لمدد طويلة جداً.

وتعرف عملية التجفيف والتبريد تحت تفريغ باسم Lyophilization وهي من الطرق الحديثة المعتادة في حفظ مزارع الكائنات الحية، أما إذا جففت الخلايا دون تجميدها أولاً فإن ذلك يؤدي إلى زيادة تركيز بروتوبلازم الخلايا، وهذا يعرض الخلايا وهي على هذه الحالة إلى عمليات البلزمة التي تؤدي بها إلى الموت السريع نظراً لقلّة محتوياتها من الرطوبة.

التمرين السادس والثلاثون

- ١- عقم ثمانية أغطية شرائح نظيفة، وذلك بطريقة التلبيب الكحولى عدة مرات ثم ضع كل أربعة منها فى طبق بترى معقم .
- ٢- انقل نقطة صغيرة من مزرعة البكتيره *E. coli* (٢٤ ساعة) إلى مركز أغطية الشرائح فى أحد الأطباق، وأنقل نقطة صغيرة من مزرعة *Bacillus subtilis* (٧٢ ساعة) إلى مركز الأغطية فى الطبق الآخر .
- ٣- ضع الأطباق فى كل الحضان واترك النقط لتجف بداخل الطبق .
- ٤- بواسطة ملقط معقم أنقل غطاء شريحة واحد بعد أن يجف ما عليه إلى طبق بترى معقم ثم صب عليه كمية من بيئة الآجار المغذى بعد إسالتها وتبريدها لدرجة ٥٠م ثم رج محتويات الطبق جيداً لتوزع به البيئة .
- ٥- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٧م .
- ٦- أترك باقى الأغطية فى أطباقها بداخل الحضان لمدة ٤٨ ساعة ثم كرر العملية كل ٤٨ ساعة .
- ٧- قدر عدد المستعمرات التى تظهر على سطح بيئة الآجار .
- ٨- دون النتائج المتحصل عليها فى جدول .

٦- تأثير التوتر السطحي Effect of surface tension

بعض البكتيريات تنمو على البيئات السائلة مكونة غشاء منتظم أو متقطع فوق سطح البيئة ، وتعرف هذه البكتيريات المكونة لنمو غشائى pellicle growth ومن المعروف أن هذه المجموعة من البكتيريات تكون هوائية إجباراً أو هوائية إختياراً . والنمو السطحي هذا يكون عادة معتمداً على قوة توتر سطح البيئة فإذا خفضت هذه القوة بأى طريقة من الطرق فإن النمو لا يحدث على صورة غشاء بل يظهر مختلطاً ومنتشراً بالبيئة .

التمرين السابع والثلاثون

- ١- حضر ثلاث أنابيب تحتوى كل منها على ١٠ مل بيئة مرق مغذى ورقمها بقلم شمع ٣،٢،١ .
- ٢- لقح الأنابيب الثلاث بمزرعة آجار مائل بالبكتيره *B. subtilis* بعمر ٢٤ ساعة .
- ٣- أترك الأنبوبة رقم ١ كما هي ثم أضف إلى الأنبوبة رقم ٢ كمية ٥,٠ سم^٣ من مادة رسينوليوات الصوديوم Sodium ricinoleate أو أى مادة خافضة للتوتر السطحي مثل مادة الترايتون ب Triton B. 1956 بعد تخفيفه بنسبة ١ : ١٠٠٠ وللأنبوبة رقم ٣ كمية ١ سم^٣ من نفس المادة، رج الأنابيب جيداً .
- ٤- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .
- ٥- اختبر طبيعة النمو على الأنابيب الثلاث، دون نتائجك وملاحظاتك .

ثانياً: العوامل الكيماوية

يقصد بالعوامل الكيماوية تلك التى تستند إلى أسس كيماوية وتؤثر على النمو البكتيرى إما بإيقافه بصفة مؤقتة Bacteriostatic أو بصفة دائمة Bactericidal ومن أمثلة هذه العوامل التركيزات المختلفة من أيونات المعادن الثقيلة وكذلك الأصباغ وبعض المواد الأيضية السامة التى عندما يزداد تركيزها بالمزرعة يتوقف النمو كلية، وكما سبق أن ذكرنا أن بعض العوامل الفيزيائية والحيوية تحدث فعلها الضار للبكتيريات عن طريق كيماوى كما يحدث عند إفراز بعض الكائنات أثناء نموها مواد كيماوية سامة لغيرها من الكائنات .

١- تأثير المعادن الثقيلة:

يعرف فعل المعادن الثقيلة على النمو البكتيرى باسم الفعل الألويجوديناميكى *Oligodynamic action* ، فهناك بعض المعادن الثقيلة التى عندما توجد فى تركيزات منخفضة يكون فعلها ساماً على البكتيريات . ولبيان هذا التأثير تجرى خطوات العمل التالية:

التمرين الثامن والثلاثون

- ١- أسل كمية من بيئة الآجار المغذى فى ورق مخروطى واطرها لتبرد إلى درجة حرارة ٥٠م°.
- ٢- لقح البيئة بإضافة ١, ٠ مل من مزرعة البكتيره *E. coli* والنامية لمدة ٢٤ ساعة على بيئة المرق المغذى ورجها جيداً.
- ٣- صب البيئة الملقحة فى عدة أطباق بترى معقمة واطرها لتتصلب.
- ٤- ضع على سطح الآجار بأحد الأطباق عملة نحاسية أو برونزية ثم ضع بطبق آخر عملة فضية وبتطبق ثالث مسمار حديدى.
- ٥- أترك الأطباق بالحضان (٣٠م°) لمدة ٢٤ ساعة.
- ٦- لاحظ المناطق الخالية من النمو البكتيرى حول العملة والمسمار الحديدى، والتى يطلق عليها المناطق الأليجوديناميكية *Oligodynamic zones* .
- ٧- لاحظ غزارة النمو البكتيرى على حواف هذه المناطق الخالية من النمو وذلك يرجع إلى أن التركيزات الضئيلة جداً من المعادن الثقيلة والتى تصل إلى حواف المنطقة العديمة النمو لها على العكس فعلاً منشطاً للنمو البكتيرى.
- ٨- لاحظ أن البكتيريات تنمو نمواً عادياً فى باقى أجزاء التطبيق.

٢- تأثير الصبغات:

للتراكيزات المنخفضة من بعض الأصباغ مثل صبغة الكريستال البنفسجي تأثير موقف لنمو البكتيريات الموجبة دون السالبة لتفاعل جرام . إذن فالتأثير الموقف للنمو في هذه الحالة تأثير إختياري، وبغض النظر عن بعض الحالات الشاذة فإن هذا التأثير يتلازم باستمرار مع إيجابية البكتيريات لتفاعل جرام . بمعنى آخر فإن البكتيريات الموجبة لتفاعل جرام تكون دائماً حساسة لفعل التراكيزات المنخفضة من هذه الصبغة في حين أن البكتيريات السالبة لجرام تكون مقاومة للفعل الضار لهذه التراكيزات .

التمرين التاسع والثلاثون

- ١- حضر محلول بتركيز ١ : ١٠٠ من صبغة الكريستال البنفسجي في ماء مقطر .
- ٢- أضيف ١ مل من المحلول السابق إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم في أنبوبة فيصبح تركيز الصبغة ١ : ١٠٠٠ . بنفس الماصة انقل ١ , ٠ مل من هذا التخفيف إلى طبق بترى معقم ونظيف .
- ٣- انقل ١ , ٠ مل من محلول الصبغة بالتركيز السابق إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم ليصبح التركيز ١ : ١٠ , ٠٠٠ ثم انقل بنفس الماصة ١ مل من هذا التركيز إلى طبق بترى معقم .
- ٤- انقل ١ مل من محلول الصبغة بالتركيز الأخير إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم ليصبح التركيز ١ : ١٠٠ , ٠٠٠ . انقل بنفس الماصة ١ مل من هذا التركيز إلى طبق بترى معقم ونظيف .
- ٥- أسل بيئة الآجار المغذى في أربعة أنابيب (كل أنبوبة ٩ مل) وأفرغ محتويات أنبوبة واحدة بكل طبق ثم حرك الطبق إلى الأمام والخلف حتى يتم

خلط البيئة بالصبغة . لاحظ أن تركيز الصبغة في كل طبق سوف يصبح ١٠/١ التركيز المضاف .

- ٦- صب بيئة آجار مغذى في طبق خالى من الصبغة .
- ٧- بعد تصلب البيئة في كل الأطباق أقلبها وبواسطة قلم شمع ، قسم الطبق إلى قسمين وأكتب على كل قسم أسم البكتيره المستعملة في تلقيحه .
- ٨- لقح أحد قسمي الطبق بمزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من البكتيرة *E.coli* ، والقسم الآخر بمزرعة حديثة من البكتيره *Bacillus subtilis* كرر عمليات التلقيح هذه بكل الأطباق المستعملة .

- ٩- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .
- ١٠- دون النتائج بجدول واضح واضعاً علامة (+) أمام كل تركيز لتشير إلى وجود نمو، وعلامة (-) إلى غيابه . استنتج ما يمكن أن تنتجه هذه النتائج .

ثالثاً العوامل الحيوية

توجد البكتيرات عادة في بيئاتها الطبيعية مختلطة مع غيرها من الكائنات الحية الدقيقة ، ولاشك أن لهذه المعيشة المختلطة تأثيراً واضحاً على نمو وتأقلم البكتيرات في هذه البيئات . وتوجد علاقات مختلفة بين الكائنات الحية الدقيقة وبعضها في المعيشة المختلطة، فقد تنشأ فيها علاقات تضادية Antagonism أو Antibiosis ، أو معيشة تكافلية (تبادل منفعة) Symbiosis ، أو معيشة منفعة من طرف واحد حيث أن الطرف الآخر لا ينتفع أو يضار من هذه المعيشة والتي يطلق عليها التعايش الإيجابي من جانب واحد Commensalism أو أن تلازم الكائنات مع بعضها يمكنه إحداث تغييرات في البيئة لا يمكن لإحداها أن تحدثها بمفردها وتعرف هذه الظاهرة بالتعايش الإيجابي المشترك Synergism .

التضاد: Antibiosis or antagonism

للكائن الدقيق طرقاً مختلفة للمحافظة على بقائه • فهو إما أن يخرج مواد أيضية تغير من ظروف البيئة مثل تلك التي تزيد من حموضته ، أو تغير من الضغط الأسموزي أو التوتر السطحي للبيئة جاعلة إياها غير مناسبة لنمو الكائنات الأقل تحملاً لهذه الظروف غير الطبيعية • وقد يمكن للكائن الحي أن يفرز مادة سامة يمكنها أن تتدخل بطريقة ما في طرق التحول الأيضي للكائنات الأخرى بدرجة قد تمنع من نموها أو تؤدي بها إلى الموت • والطريقة الأخيرة من التضاد هي التي يطلق عليها اسم التضاد الحيوي Antibiosis • إذن يمكن تعريف ظاهرة التضاد الحيوي بأنها معيشة كائنين معاً يعمل أحدهما على إحداث ضرر واضح بالكائن الآخر نتيجة لإفرازه مادة كيميائية • والمواد الكيميائية السامة التي تفرز تعرف باسم المضادات الحيوية Antibiotics •

أولاً: التضاد الطبيعي

هو الذي يتم في وجود نمو نشط للكائن المضاد، ولدراسة هذا النوع من التضاد يتبع جملة طرق نذكر منها الطريقتين التاليتين:

الطريقة الأولى:

التمرين الأربعون

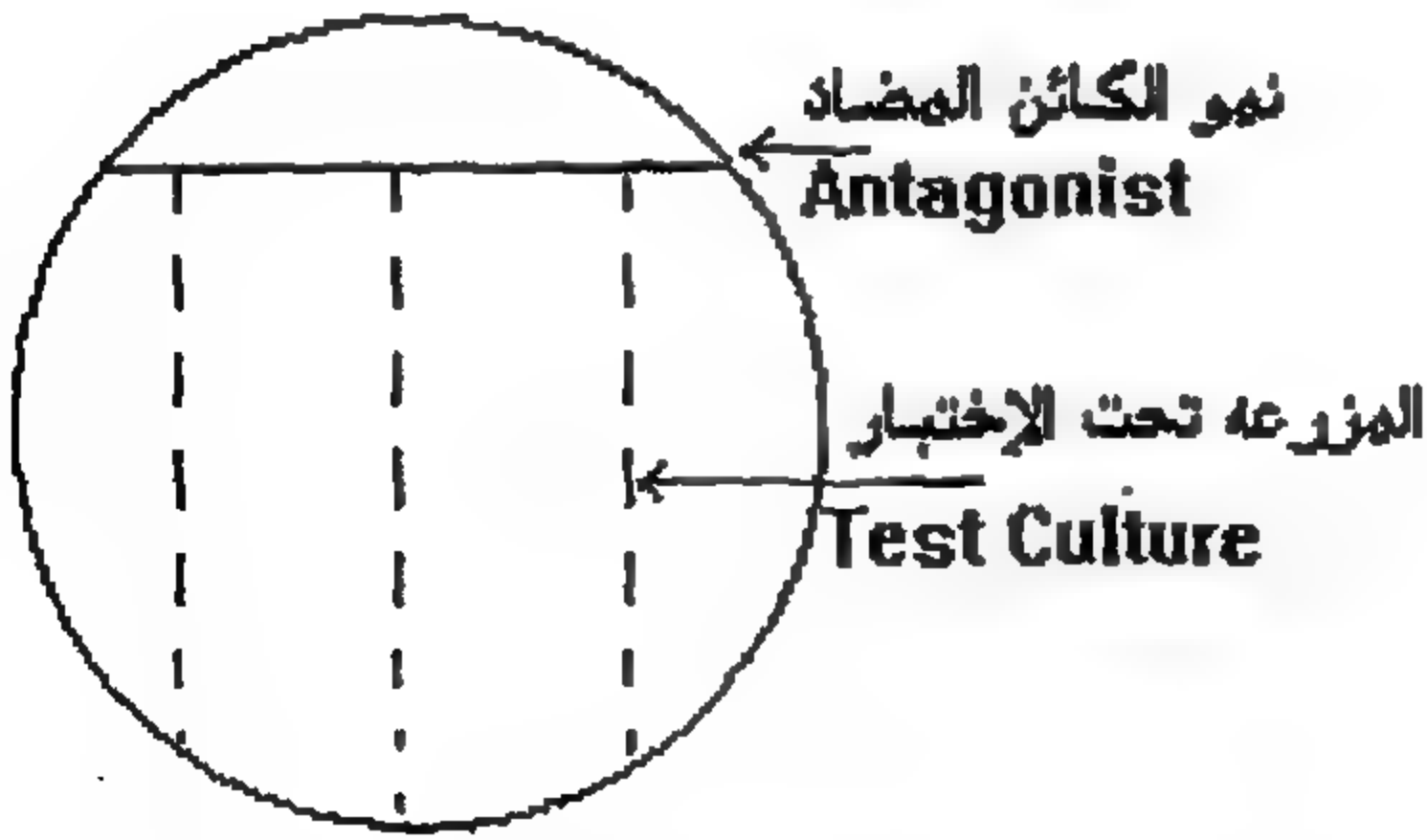
- ١- أسل بيئة آجار مغذى في أنابيب ثم أتركها لتبرد لدرجة ٥٠°م •
- ٢- لقم أنبوبيتين منهما بإضافة ١ ، • مل من مزرعة *Sarcina sp.* نامية في بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة •
- ٣- لقم الأنبوبيتين الأخرتين بإضافة ١ ، • مل من مزرعة *E. coli* نامية في بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة •

- ٤- صب كل من الأنابيب الأربعة بعد التلقيح فى طبق بترى معقم وأترك البيئة الملقحة لتتصلب وأكتب اسم البكتيره الملقحة على كل طبق .
- ٥- خطط سطح الآجار بطبق واحد من الطبقتين الملقحين بواحد من البكتيرتين المذكورتين بلقاح من مزرعة البكتيره *Bacillus subtilis* نامية على بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة .
- ٦- أترك الطبقتين الآخرين دون إعادة تلقيحها بالبكتيره *Bacillus subtilis*
- ٧- ضع الأطباق مقلوبة بالحضان (٣٠م) لمدة ٤٨ ساعة ثم إفحصها باحثاً عن مناطق خالية من النمو البكتيرى حول خطوط نمو البكتيره *Bacillus subtilis* ودون نتائجك فى جدول .

الطريقة الثانية:

التمرين الحادى والأربعون

- ١- صب بيئة دكستروز آجار البطاطس ، (أنظر ملحق البيئات)، أو بيئة الآجار المغذى فى ٤ أطباق وأتركها لتتصلب .



- ٢- أغمس إبرة تلقيح ذات العقدة بعد تعقيمها فى مزرعة حديثة من البكتيره *Bacillus subtilis* . ثم خطط سطح الآجار فى طبقتين وذلك بعمل خطأ مستعرضاً بكل

شكل ٣٩: إحدى طرق دراسة التضاد الطبيعى .

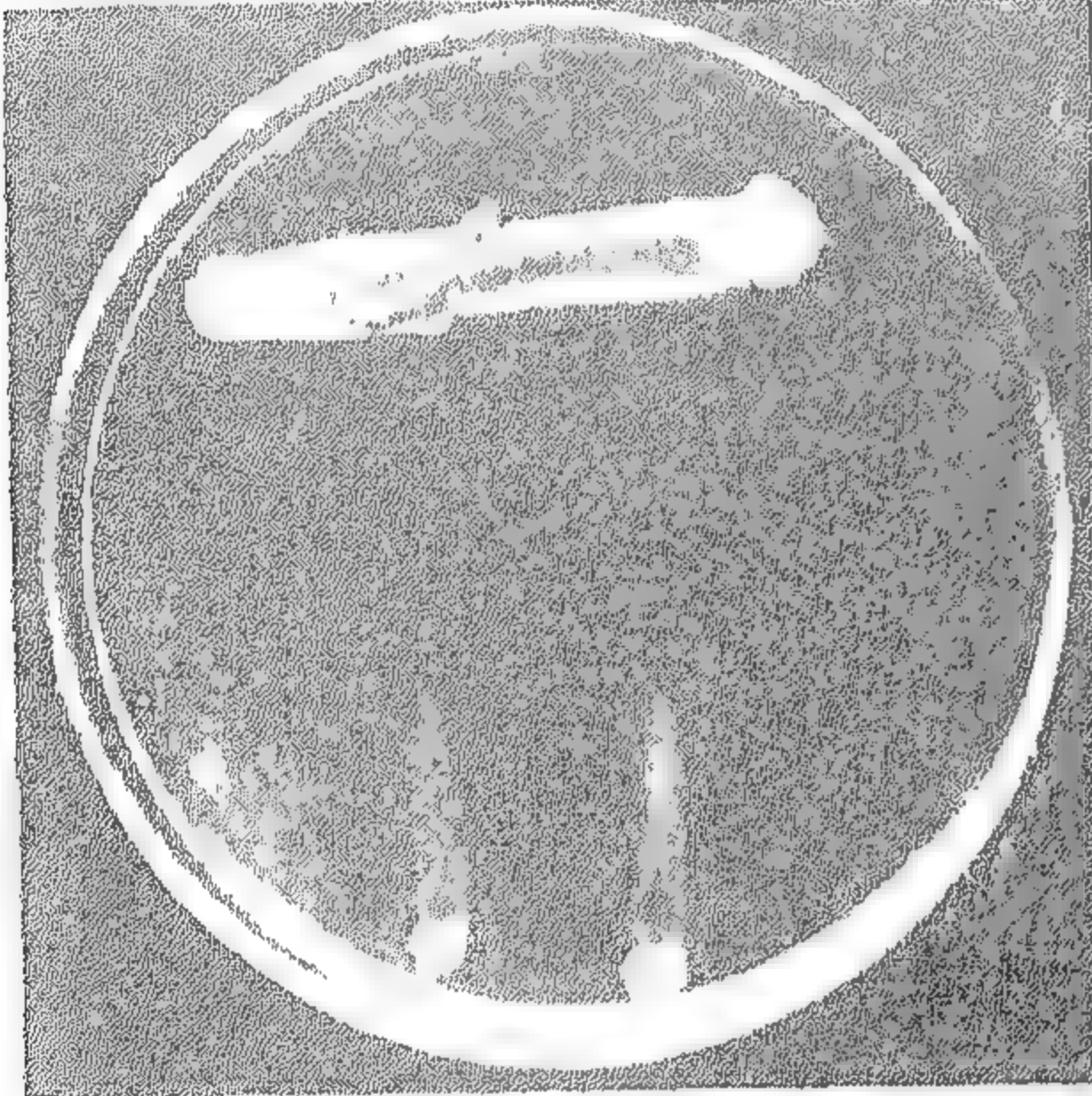
طبق يبعد حوالى بوصة عن حافة الطبق (شكل ٣٩) .

- ٣- كرر ما سبق ولكن باستعمال معلق من جراثيم الفطر *Penicillium patulum* يخطط به سطح الآجار قرب حافة طبقتين آخرين .

٤- ضع الأطباق بالحضان (٣٠م) لمدة ٤٨ ساعة .

٥- بعد إنتهاء فترة التحضين خطط سطح الأجار بشكل خطوط متعامدة على النمو البكتيرى أو الفطرى الناتج بعد التحضين وذلك بإبرة تلقيح سبق غمسها فى مزرعة من النوع البكتيرى تحت الإختبار Test culture ويستعمل لذلك مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من *E. coli* و أخرى من *Pseudomonas solanacearum* (مزرعة بكل طبق) .

٦- ضع الأطباق بالحضان (٣٠م) مرة أخرى لمدة ٤٨ ساعة ثم أفحصها ملاحظاً وجود مناطق خالية من النمو على طول خطوط تلقيح الكائن المختبر مستعيناً بشكل ٤٠ .



شكل ٤٠: التضاد الطبيعى الذى يحدثه الفطر *Penicillium patulum* لنمو البكتيره *Pseudomonas solanacearum* (لاحظ القوة التضادية للفطر من درجة اتساع المنطقة الخالية من النمو البكتيرى) .

ثانياً: دراسة تأثير التحضيرات التجارية من المضادات الحيوية:

يوجد بالأسواق عدد كبير من المضادات الحيوية Antibiotics يمكن التعرف على تأثيرها فى منع نمو الكائنات البكتيرية دون الحاجة إلى إستعمال الكائن المضاد الذى يفرز هذه المضادات الحيوية . ولمثل هذه الدراسات عدة طرق نذكر منها الطريقة التالية:

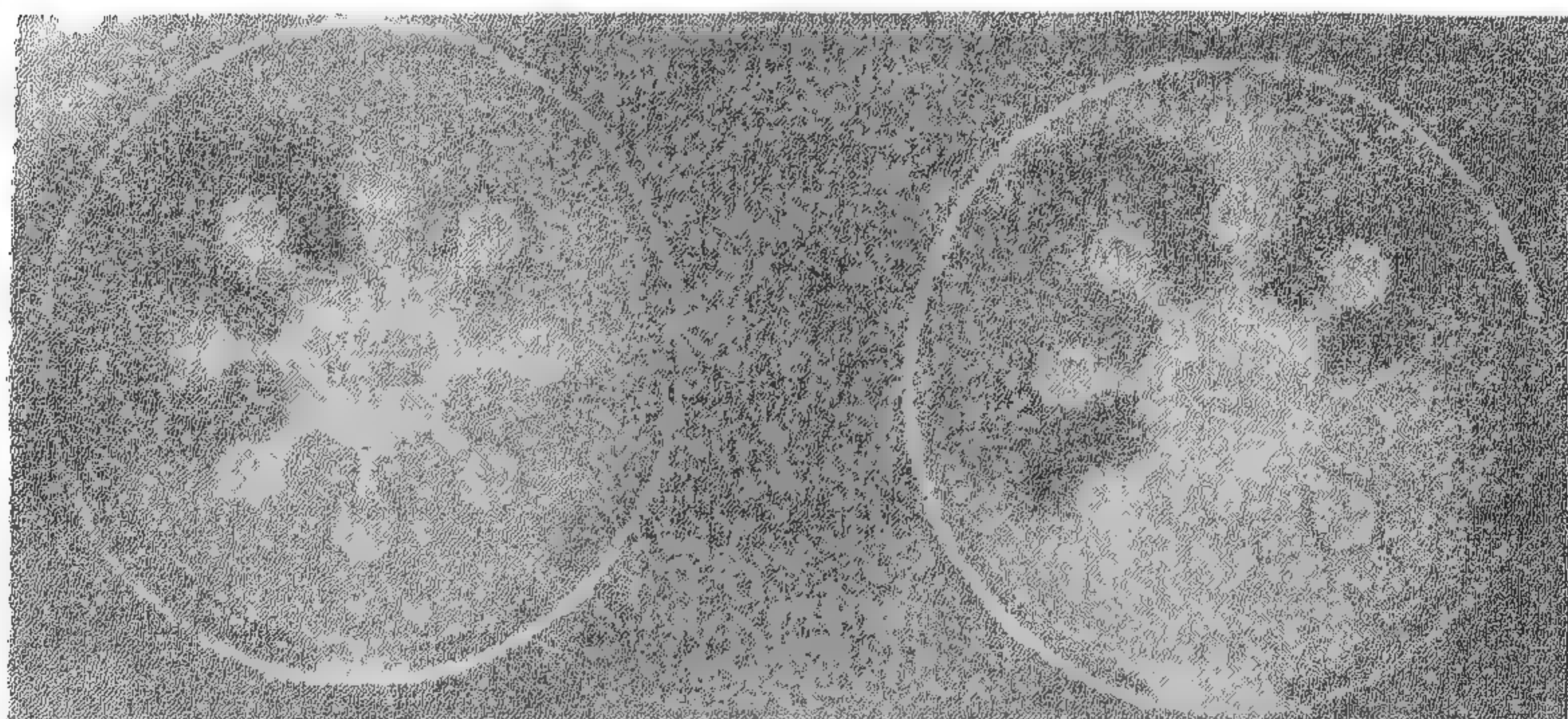
طريقة أقراص ورق الترشيح:

التمرين الثانى والأربعون

- ١- حضر محاليل ذات تركيز ٢٠٠ ميكروجرام / ١ مل من المضادات الحيوية الآتية: بنسلين Penicillin ، ستربتومايسين Streptomycin ، أو أوكسى تتراسيكلين Oxytetracycline .
- ٢- جهز أقراص من ورق ترشيح ماص بقطر ٧ مم ثم ضعها فى طبق بترى نظيف ثم عقمها فى الأوتوكلاف .
- ٣- أسل ثلاث أنابيب آجار عميق (١٥ مل بيئة آجار مغذى) ثم أتركها لتبرد (٥٠م) .
- ٤- لقح أحد الأنابيب بإضافة ١ مل من مزرعة حديثة من البكتيره *E. coli* والأنبوبة الثانية بكمية متساوية من مزرعة حديثة من البكتيره *Bacillus subtilis* والأنبوبة الثالثة بمزرعة من البكتيره *Staphylococcus aureus* .
- ٥- صب الأنابيب الثلاث بعد التلقيح فى ثلاثة أطباق بترى معقمة وأتركها لتتصلب وأكتب اسم البكتيره الملقحة بكل طبق .
- ٦- إقلب الطبق وقسم قاعه بواسطة قلم شمع إلى ثلاثة أقسام متساوية وأكتب على كل قسم اسم أحد المضادات الحيوية بالقلم الشمع .
- ٧- أضف ٠,٥ مل من المضاد الحيوى بواسطة ماصة دقيقة معقمة إلى أحد أقراص ورق الترشيح ثم ضعه بواسطة ملقط معقم فى وسط القسم المخصص له مع الضغط البسيط على القرص حتى يلتصق بسطح الآجار . كرر ذلك باستعمال قرص لكل مضاد حيوى . (يلاحظ أن كمية المضاد الحيوى تكون فى هذه الحالة ١٠ ميكروجرام لكل قرص من كل مضاد حيوى) .
- ٨- حضن الأطباق فى حضن على درجة ٣٠م لمدة ٢٤ ساعة ثم إفحصها للتأكد من وجود منطقة خالية من النمو البكتيرى حول القرص . قدر

قطر المنطقة الخالية من النمو التي تتناسب كمياً مع حساسية البكتيره المعينة لمضاد حيوى معين • سجل النتائج فى جدول •

ملحوظة: يوجد بالأسواق أقراص مجهزة من ورق ترشيح تحمل كميات معلومة من المضاد الحيوى • وقد يكون كل قرص منفرداً Unidisk أو قد تكون عبارة عن قرص مكون من عدد من الأقراص الصغيرة متصلة ببعضها مركزياً (شكل ٤١) يحتوى كل قرص منها على مضاد حيوى مختلف بتركيز معين • وتعرف مجموعة الأقراص بالقرص المتعدد Multidisk ويلاحظ أن استعمال هذه الأقراص يسهل كثيراً من إجراء الاختبار •



شكل ٤١: تأثير المضادات الحيوية على نمو سلالتين من البكتيره

Agrobacterium tumefaciens باستعمال طريقة القرص

المتعدد Multidisk method

(لاحظ أن كل قرص صغير يحتوى على مضاد حيوى مختلف عن الآخر) •

الاختبارات البيوكيميائية (الفسولوجية)

إن من أهم الدراسات التى تجرى على الكائنات البكتيرية بهدف التعرف عليها هى دراسة الصفات الفسولوجية أو البيوكيميائية التى تظهر نتيجة لفعل

العديد من الإنزيمات البكتيرية • وعادة تختلف البكتيريا في مدى إحتوائها على هذه الإنزيمات وهذا يؤدي إلى الاختلافات التي نشاهدها من نتائج الاختبارات البيوكيميائية • والبعض يمتلك إنزيمات تحلل النشا أو الجيلاتين في حين أن البعض الآخر لا يمتلك هذا النوع أو غير، من الإنزيمات •

إختبار إنزيمات التحلل المائي Hydrolyses :

تختلف البكتيريا كما سبق أن بينا في قدرتها على تحليل المواد العضوية ذات الجزيئات الكبيرة الحجم مثل النشا والسليولوز والجيلاتين والكازين • ويتم تحلل هذه المواد في وجود الماء أى يكون التحلل مائياً Hydrolysis بغرض تحويلها إلى مواد ذات جزيئات أقل حجماً يسهل على الخلايا امتصاصها •

أ. تحلل النشا مائياً Starch hydrolysis

حيث أن العديد من البكتيريا لها القدرة على تحليل النشا مائياً، لذلك فكان لهذا الإختبار أهمية كبرى للتعرف على الأنواع البكتيرية المختلفة • وجزء النشا كبير يتكون من مكونين أساسيين:-

أحدهما الأميلوز ويتكون من ٢٠٠-٣٠٠ وحدة من سكر الجلوكوز مرتبطة في سلسلة مستقيمة بعضها ببعض بالرابطه الجلوكوسيدية ١،٤ وثانيهما مركب الأميلوبكتين وهو سلسلة طويلة ومتفرعة من وحدات من سكر الجلوكوز ومجاميع فوسفورية مرتبطة ببعضها بالروابط سالفة الذكر ولكن عند مواضع التفرع يكون الإتصال بروابط جلوكوسيدية ١،٦ •

والبكتيريا التي تملك القدرة على تحليل النشا تفرز أربعة أنواع من الإنزيمات:

١- ألفا أميلاز α amylase ويعرف أيضاً بالأميلاز الداخلى

Endoamylase والإنزيم يحلل الروابط الجلوكوسيدية ١،٤ الداخلية فى السلاسل

الطويلة فتتكسر إلى وحدات لا زالت كبيرة الحجم وذلك فى الأميلاز أما فى حالة الأميلوبكتين ففعلها يتوقف عند روابط التفرع .

٢- بيتا أميلاز β amylase وتعرف أيضاً بالأميلاز الخارجى Exoamylase فهى تحلل أيضاً الروابط الجلوكوسيدية ٤،١ الخارجية (أى فى أطراف السلاسل) وتزيل وحدات من المالتوز من الأطراف غير المختزلة .

٣- وعلاوة على هذين النوعين من الإنزيمات يوجد إنزيم يعرف باسم أميلو ٦-١ جلوكوسيداز يحلل الروابط الجلوكوسيدية ٦،١ الموجودة فى أماكن تفرع الأميلوبكتين .

٤- إنزيم المالتيز Maltase والذى يحلل وحدات سكر المالتوز الناتجة إلى وحدات من سكر الجلوكوز والذى يهاجم فيما بعد بإنزيمات التنفس أو التخمر داخل الخلايا. ولأختبار قدرة الأنواع البكتيرية على تحليل النشا أتبع الخطوات التالية :

التمرين الثالث والأربعون

- ١- أسل بيئة آجار مغذى معقمة ومحتوية على نشا قابل للذوبان بنسبة ٢٪ ثم صبها فى ثلاثة أطباق بترى واتركها لتتصلب .
- ٢- لقح عن طريق التخطيط سطح الآجار فى أحد الأطباق بمزرعة بكتيرية معلومة وليكن *E.coli* والطبق الثانى بمزرعة معلومة أيضاً ولتكن *Bacillus subtilis* واترك الطبقة الثالث دون تلقح .
- ٣- ضع الأطباق بالحضان لمدة ٤٨ ساعة على درجة ٣٧° م .
- ٤- بعد أنقضاء مدة الحضانة أغمر سطح البيئة بمحلول لوجول اليود Lugol's iodene solution .

٥- أفحص الأطباق ولاحظ المناطق عديمة اللون حول خطوط النمو واللون الأزرق بعيداً عن خطوط التلقيح وهذا يدل على تحلل النشا حول النمو البكتيري - أما إذا لم توجد مناطق عديمة اللون حول النمو فهذا يعني عدم قدرة البكتيرة على تحليل النشا (شكل ٤٢) .

ب- تحلل السليولوز

السليولوز من عديدات السكر يتكون أيضاً من سلاسل طويلة من بيتا-جلوكوز ترتبط بعضها ببعض بروابط (جلوكوسيدية ١-٤) وله وزن جزيئي مرتفع قد يصل إلى ٣٠٠٠٠٠ أو أكثر ويوجد بالجدر الخلوية الثنائية و يكون متناسقاً في بعض المناطق من الجدار ويعرف بالسليولوز المتبلور Crystalline cellulose أو غير متناسقاً ويعرف بالسليولوز غير المنظم Amorphous cellulose . وبعض البكتيرات تحلل السليولوز إما تحت ظروف هوائية أو غير هوائية - وينتج عن عملية التحلل وحدات من سكر الجلوكوز وهذه العملية لها أهمية كبرى في الطبيعة حيث تقوم البكتيرات بالتخلص من بقايا النباتات بالتربة عن هذا الطريق - كما أنها وغيرها من الكائنات الدقيقة التي تعيش في كرش الحيوانات المجتررة تعمل على تحليل وهضم السليولوز الذي تتغذى عليه هذه الحيوانات المنتجة للحم واللبن . وهناك نظريتان لتحلل السليولوز :-

- ١- نظرية الانزيمين ويعمل بها أنزيم السليولاز cellulase الذي ينتج عنه مركب السيلوبيوز cellabiose الأقل تعقيداً - ثم أنزيم السلوباييز cellobiase الذي ينتج عنه وحدات من سكر الجلوكوز .

٢- نظرية الانزيمات المتعددة

ويعمل فيها مجموعة من الأنزيمات أولها أنزيم يطلق عليه C1 الذى ينتج عنه مركب خالى من الماء Polyanhydro glucose ثم مجموعة من أنزيمات Cx (أ-ب-ج) ينتج عنها وحدات من السلوبيوز cellobiose والجلوكوز- والمادة الأولى تتحلل بواسطة إنزيم السلوبياز cellobiase إلى جلوكوز أيضاً. وفيما يلي خطوات دراسة تحليل السليولوز هوائياً.

التمرين الرابع والأربعون

- ١- حضر ثلاث أنابيب محتوية على ٥ مل من بيئة ديبوس Dubos meduem.
- ٢- أضف لكل أنبوبة ١, ٠ جم سماد بلدى ثم أغمر فيها شريط من ورق الترشيح نظيف بعمق البيئة على أن يبرز منها ٢/١ سم بالقمة .
- ٣- عقم أنبوبة واحدة من الثلاث أنابيب .
- ٤- أحفظ الأنابيب الثلاث فى حضان على درجة ٣٠°م لمدة ٧-١٤ يوماً .
- ٥- أفحص الأنابيب - نلاحظ تآكل ورقة الترشيح إلى سطح البيئة .
- ٦- حضر غشاء من كل أنبوبة وأصبغه بصبغة جرام وأخرى بالصبغ السالب للتعرف على شكل الكائنات المحللة للسليولوز هوائياً .

خطوات تحليل السليولوز تحت ظروف غير هوائية :

التمرين الخامس والأربعون

كرر ما سبق تحت رقم ٢٠١ من التمرين السابق

٣- غطى سطح البيئة بمزيج فاسبار Vaspar mixture بعد إسالته لتوفير ظروف غير هوائية نسبياً في حالة غياب المزيج المذكور يمكن إضافة ٢ مل من زيت البرافين .

٤- عقم أنبوبة من الثلاث أنابيب بالأوتوكلاف .

٥- أحفظ الأنابيب بالحضان لمدة ١٥ يوماً على درجة ٣٠° م .

٦- لاحظ حدوث نمو وتحلل لورقة الترشيح تحت مزيج فاسبار أو زيت البرافين في الأنابيب غير المعقمة .

ج- تحليل الجيلاتين

الجيلاتين عبارة عن بروتين حيواني يمكن لبعض البكتيريا أن تحلله لامتلاكها أنزيم خارجي هو أنزيم الجيلاتيناز Gelatinase وعادة يتوقف إفراز هذا الانزيم في البكتيريا المفترزة له إذا ما نميت في بيئات محتوية على الكربوهيدرات طبقاً للظاهرة المعروفة بفعل الكربوهيدرات الموفر للبروتينات Protein sparing action لذلك عند إجراء اختبار تحليل الجيلاتين يشترط خلو البيئة من الكربوهيدرات - واختبار أسالة الجيلاتين في الجيلاتين العميق بالأنابيب (راجع الصفات المزرعية صفحة ٤٧) في الاختبارات الهامة في أعراض التقسيم والتصنيف هذا ويجب أن نلاحظ أن قدرة البكتيريا على تحليل الجيلاتين لا تعنى بالضرورة أن لها قدرة على تحليل البروتينات الأخرى ولإجراء الاختبار يجرى الآتي :

التمرين السادس والأربعون

- ١- لقم سطح بيئة آجار مغذى محتوية على ١٪ جيلاطين فى طبقى بترى بكل من مزرعة من *E. coli* وأخرى من *Bacillus subtilis* .
- ٢- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٢٠°م لمدة ٩٦ ساعة .
- ٣- أخرج الأطباق ثم أغمر سطحها بمحلول من ٥٪ سلفات الألمنيوم أو محلول ١٥٪ كلوريد زئبق محمض أو بأحد الأحماض المخففة واتركه لبضع دقائق ثم تخلص من المحلول .
- ٤- أفحص سطح الطبق بالقرب من خطوط النمو لاحظ ظهور منطقة رائقة حول هذه الخطوط فى حالة البكتيريات المفرزة للجيلاطيناز نظراً لتحلل الجيلاتين فى هذه المناطق كما نلاحظ تكون راسب أبيض بالآجار بعيداً عن خطوط النمو نظراً لترسب الجيلاتين غير المحلل فى هذه المناطق — كما يظهر أيضاً هذا الراسب الأبيض حول خطوط تلقيح البكتيريات غير القادرة على تحليل الجيلاتين .

د- تحلل الكازين Casein hydrolysis

الكازين هو البروتين السائد فى اللبن ووجوده يعطى اللبن لونه الأبيض المميز - وكثير من البكتيريات تفرز أنزيماً خارجياً هو أنزيم Caseinase والذى يحلل الكازين إلى خليط من المواد الذائبة الشفافة ويعرف بعملية تحلل الكازين أيضاً بأسماء أخرى مثل Proteolysis أو Peptonization وفيما يلى خطوات إجراء الاختبار :

التمرين السابع والأربعون

- ١- أسل ثلاث أنابيب آجار مغذى ثم أتركها لتبرد إلى درجة ٤٥° م .
- ٢- ضع ١ مل من اللبن الفرز (خالى من الدهن) ومعقم فى كل أنبوبة من الثلاث أنابيب .
- ٣- صب أنبوبة بكل من ثلاثة أطباق بترى معقمة ثم حرك الأطباق لتوزيع اللبن بالبيئة جيداً ثم أترك الآجار ليتصلب .
- ٤- لقح سطح الآجار بالأطباق عن طريق التخطيط بلقاح من مزرعة حديثة من *E.coli* وبالطبق الثانى لقاح من مزرعة حديثة من *Bacillus subtilis* والطبق الثالث بمزرعة حديثة من *Streptococcus lactis* .
- ٥- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٠° م لمدة ٤٨ ساعه ثم أفحصها لاحظ وجود مناطق رائقة بجوار نمو البكتيرى من عدمه ودون النتائج - وفى حالة وجودها يدل ذلك على تحلل الكازين (شكل ٤٣) .

هـ- تحلل الدهون

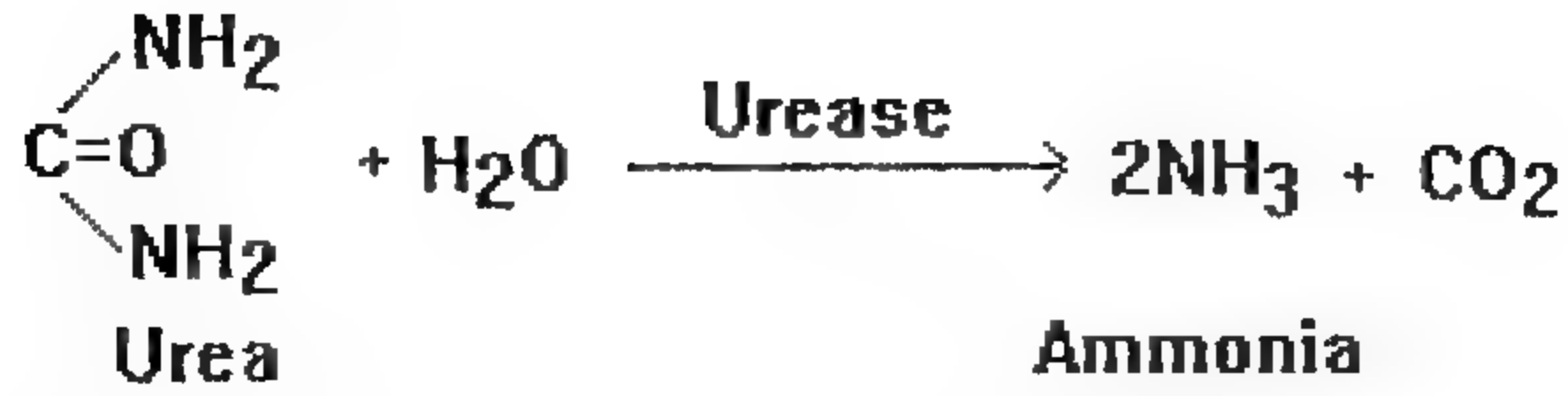
إن قدرة الكائن البكتيرى على تحليل الدهون يرجع إلى إفراز إنزيم Lipase وهذا الأنزيم يقسم جزئ الدهن إلى جزئ جلسرول وثلاثة جزيئات من ثلاثة أحماض دهنية - وناتج هذا التحلل تستخدمه الخلية البكتيرية فى تخليق الدهون البكتيرية وغيرها من المواد اللازمة للخلية - وفى بعض الأحيان تحت الظروف الهوائية يحدث للجلسرول والأحماض الدهنية الناتجة من التحلل عملية أكسدة يكون نتيجتها الحصول على الطاقة - وقدرة البكتيرات على تحليل الدهون يعتبر من الأمور الهامة فى ترنيخ الأطعمة المحتوية على دهون Rancidity وفيما يلى خطوات إجراء الاختبار :

التمرين الثامن والأربعون

- ١- أسل ٥٠ مل من بيئة الآجار المغذى بدورق مخروطى ثم أضف إليها ١ مل من زيت بذرة القطن المعقم ثم أمزج الزيت بالبيئة جيداً .
- ٢- صب البيئة فى عدد من أطباق بترى معقمة واتركها لتتصلب .
- ٣- لقح سطح الآجار بأحد الأطباق عن طريق التخطيط بمزرعة حديثة من *E.coli* وطبق آخر بمزرعة حديثة من *Bacillus subtilis* وطبق ثالث بالبكتيرة *Pseudomonas marginata* .
- ٤- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٩٦ ساعة .
- ٥- أغمر سطح الأطباق بكمية كافية من محلول ١٠٪ كبريتات نحاس واتركها لمدة ١٠ دقائق ثم تخلص بعدها من المحلول . أترك الأطباق لمدة ٥ دقائق أخرى ثم أفحصها .
- ٦- وجود لون أخضر على طول خطوط النمو يدل على تحلل الزيت يستحسن تعريض الأطباق لضوء صناعى أثناء الفحص .

و- تحلل اليوريا

إن إجراء اختبار تحلل اليوريا هام جدا فى التعرف على البكتيرات التى تعيش أو تصيب أمعاء الإنسان فهى تعمل على التفرقة بين مجموعة *Proteus* من البكتيرات الممرضة السالبة لجرام . ومن أهم مميزات أفراد جنس *Proteus* هو تحليل اليوريا وإفراز أنزيم Urease والذى يفصل الأمونيا من جزئ اليوريا. وهذه القدرة غير موجودة فى الكائنات الممرضة السالبة لجرام التى يمكن أن تتشابه فى صفات أخرى مع أفراد جنس *Proteus* .



ومرق اليوريا Urea broth هو عبارة عن محلول منظم Buffered solution من مستخلص الخميرة واليوريا . ويحتوى أيضاً على دليل الفينول الأحمر Phenol red وحيث أن اليوريا غير ثابتة وتتحلل بسرعة عند التعقيم بالأوتوكلاف لذلك يجب تعقيم مرق اليوريا بالترشيح - ويعبئ فى أنابيب بكميات صغيرة ليسرع من رؤية نتائج التفاعل .

وعندما يفرز أنزيم اليورياز Urease فى البيئة بواسطة البكتيرة ، فإن الأمونيا المنطلقة ترفع من قيمة pH . وبذلك يتغير لون دليل الفينول الأحمر من اللون الأصفر pH 6.8 إلى اللون الأحمر pH 8.1 أو أكثر .

أختبر أنبوبة مرق اليوريا الملقح بالبكتيرة *Proteus vulgaris* - ودون لون المزرعة .

يمكن الكشف عن الأمونيا الناتجة عن تحلل اليوريا فى بيئة مرق اليوريا الخالى من الكاشف الفينول الأحمر - وذلك بأضافة كمية محلول نسلر إلى المزرعة نلاحظ تكون راسب لونه أصفر أو أصفر غامق أو راسب بني حسب كمية الأمونيا الناتجة (شكل ٤٤) .

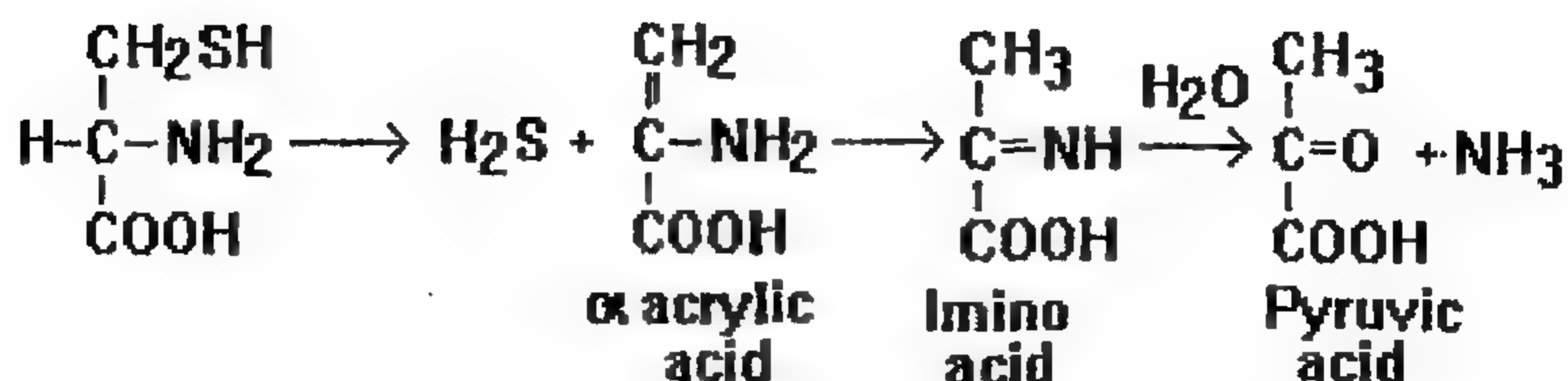
تحلل الأحماض الأمينية

الأحماض الأمينية وهى ناتج تحلل البروتينات يمكن لبعض البكتيرات أن تهاجم البعض منها محللة إياها إلى مواد أبسط تركيباً لها خواصها التى يمكن التعرف عليها ومن هذه الأحماض الأمينية ما يأتى :

أولاً: إختبار إنتاج كبريتوز الأيدروجين H₂S production

بعض البكتيرات مثل *Proteus vulgaris* تكون غاز كبريتوز الأيدروجين عند تحللها للحمض الأميني سيستين Cysteine وهذه البكتيرة تفرز أنزيم يعرف بأسم سيستين ديسلفوراز Cysteine desulfurase .

وأنزيم سستائين ديسلفوراز يعمل بمساعدة المرافق الأنزيمي Pyrodoxal phosphate وتعتبر هذه الخطوة الأولى فى فصل الأمونيا من الحمض الأميني .



باستعمال بيئة كليجلر Kiligler's iron medium يمكنها أن تكشف عن إنتاج كبريتوز الأيدروجين حيث أنها تحتوى على كلوريد الحديدوز والذي يتفاعل مع H_2O ليكون راسب أسود من iron sulfide والبيئة تحتوى أيضاً على جلوكوز ولاكتوز وأحمر الفينول فهى يمكنها أيضاً الكشف عن قدرة تخمير الجلوكوز واللاكتوز .

ومن الأحماض الأمينية المحتوية على ذرات من الكبريت حمض السستين Cystine والسستائين Cysteine والتي عند تحليلها ينطلق غاز كبريتوز الأيدروجين ذو الرائحة الكريهة المميزة والذي يمكن الكشف عنه أيضاً بطرق كيمائية بسيطة

وللكشف عن إنتاج غاز كبريتوز الأيدروجين يجرى التمرين الآتى :

التمرين التاسع والأربعون

١- حضر مزرعة حديثة بعمر ٢٤ ساعة لكل من *Proteus vulgaris*

. *E.coli*

٢- حضر أنابيب آجار عميق من بيئة كليجار Kligler المحتوية على كبريتات الحديدوز .

٣- لقح أنبوبتين بطريق الوخز بكل من المزارع البكتيرية وأحتفظ بأنبوبة ثالثة بدون تلقيح .

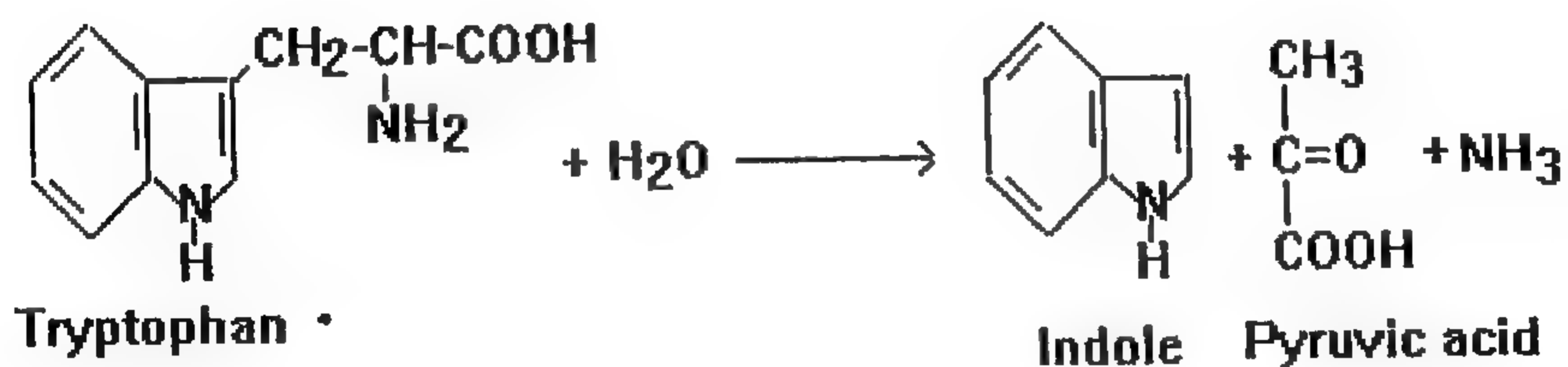
٤- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ١٧ يوم .

٥- أفحص الأنابيب لاحظ تكون لون أسود على طول خط التلقيح في حالة تكون غاز كبريتوز الأيدروجين (شكل ٤٥) كما لاحظ تغير لون البيئة من اللون الأحمر إلى اللون الأصفر نتيجة لأنخفاض قيمة الـ pH لتكون أحماض .

ثانياً: تحلل الأحماض الأمينية الحلقية

١- الترتيب وفان

بعض البكتيريا مثل *E.coli* لها القدرة على تحليل جزئ التربتوفان وتشطره إلى جزئ إندول وجزئ حمض بيروفيك بالاستعانة بالأنزيم Tryptophanase



وممكن الكشف عن الاندول الناتج بأستعمال كاشف كوفاك Kovack's reagent - وهذا الاختبار هام نظراً لأنه يميز البكتيره *E.coli* من بكتيرات القولون المشابه لها. هذا ونلاحظ أن بعض البكتيرات قد تظهر نتائج سلبية لهذا

الأختبار بالرغم من قدرتها على تحليل التربتوفان ولكن ذلك يرجع إلى قدرتها على تحليل الأندول الناتج أيضاً . وفيما يلي خطوات التمرين .

التمرين الخمسون

- ١- حضر مزرعة حديثة من كل من *E.coli* ، *Bacillus subtilis* .
- ٢- حضر ثلاثة أنابيب محتوية على بيئة مرق التربتون الغنية بالحمض الأمينى تربتوفان .
- ٣- لقح أنبوبة من البيئة بكل من البكتيرتين أترك أنبوبة ثالثة بدون تلقيح للمقارنة .
- ٤- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .
- ٥- اكشف عن وجود الأندول بنقل ٤ مل من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة ثم أضف إليها ٣ ، - ٤ ، مل من كاشف كوفاك . رج الأنبوبة ثم أتركها قليلاً ليطفو كاشف كوفاك إلى السطح مع تلون الطبقة السطحية من الأنبوبة باللون الأحمر الغامق في حالة النتائج الإيجابية (شكل ٤٦) .

٢- الفيناييل الانين

تمتلك بعض البكتيرات أنزيم Phenyl alanine aminase ليفصل فيه مجموعة الأمين التي تنطلق في صورة نشادر وتاركة مركب phenyl pyruvic والأخير يمكن الكشف عنه بأضافة كلوريد الحديدك فيتكون لون أخضر مميز - وفيما يلي خطوات الأختبار .

التمرين الواحد والخمسون

- ١- ضع ما يلي في أنبوبة اختبار صغيرة : نقطتين من محلول ٠.٣ , جزيئي من الفينيل الالانين ثم نقطتين من محلول ٠.٢٥ , جزيئي منظم pH فوسفاتي pH6.4 ثم نقطتين من معلق كثيف لخلايا حديثة للبكتيرة المراد اختبارها.
- ٢- ضع الأنبوبة بالحضان على درجة ٢٨°م لمدة ساعتين .
- ٣- أضف نقطتين من محلول ٥ , جزيئي من كلوريد الحديدك إذا ظهر لون أخضر دل ذلك على وجود حمض Phenyl pyruvic الناتج عن إنحلال Phenyl alanine .

ثالثاً : تحلل الأرجينين Arginine hydrolysis

يتحلل هذا الحمض الأميني مائياً بواسطة بعض البكتيرات منتجاً أمونيا يمكن الكشف عنها بواسطة محلول نسلر وفيما يلي خطوات الاختبار :

التمرين الثاني والخمسون

- ١- حضر أنابيب بيئة مرق الأرجينين وهي تتكون أساساً من ٥ جم تربتون و ٥ جم مستخلص خميرة و ٢ جم فوسفات بوتاسيوم أحادي الأيدروجين و ٣ جم ل - أرجينين مونو هيدروكلوريد و ٥ , جم نكستروز و ١٠٠٠ مل ماء مقطر أضبط pH إلى ٧ pH ٠ عقم على درجة حراره ١١٥°م تحت ضغط ١٠ ارطل/بوصه^٢ لمدة ١٠ دقائق .
- ٢- لقح أنابيب بيئة مرق الارجينين بالبكتيرة المراد اختيارها وتوضع بالحضان على الدرجة المناسبة للبكتيرة لمدة ٤٨ ساعة .

٣- يضاف قطرات من محلول نسلر إلى المزرعة - ظهور لون بني يدل على تحلل الأرجينين في البيئة .

رابعاً : الكشف عن الأنزيمات المزيلية لمجاميع الكربوكسيل من الأحماض
الأمينية Amino acid decarboxylases

التمرين الثالث والخمسون

- ١- ضع في أنبوبة اختبار صغيرة ما يلي :
 - ٢ نقطة من محلول ١٪ من حمض الليوسين أو الميثيونين .
 - ٢ نقطة من محلول فوسفاتي منظم pH 5 .
 - ٢ نقطة من محلول بروموكريزول أرجواني .
 - ٢ نقطة من معلق كثيف من خلايا حديثة السن للبكتيريا المراد دراستها.

٢- ضع الأنبوبة بالحضان على درجة ٢٨°م لمدة ٢-٦ ساعات إذا حدث تغير في لون المخروط دل ذلك على نشاط أنزيمات Decarboxylases .

التغيرات التي تحدثها الأحياء الدقيقة في بيئة لبن عباد الشمس

تحدث الأحياء الدقيقة عدة تغيرات في بيئة عباد الشمس Litmus milk نتيجة لنموها عليه وتختلف البكتيريا في قدرتها على إحداث هذه التغيرات. إن بيئة لبن عباد الشمس Litmus milk تحتوى على ١٠٪ لبن مجفف خال من الدسم وكمية من دليل عباد الشمس Litmus كدليل لقيمة pH وعندما نحضر البيئة نضبط قيمة pH بها إلى ٦,٨ (وتعتبر بيئة غنية ومناسبة لنمو العديد من الكائنات ويمكن الاستعانة بهذا الاختبار في التعرف على الكائنات المجهولة) وهذا الاختبار علاوة على أنه يظهر القدرة التخمرية للكائن من عدمه

إلا أنه أيضاً يختبر القدرة التحليلية للبروتينات (بروتين اللبن - الكازين) والعديد من الكائنات ذات القدرة الاختزالية تختزل عباد الشمس مؤدية إلى إزالة لونه بدرجات مختلفة تبعاً لقدراتها الاختزالية فبعض الكائنات تتطلب ٤-٥ أيام لإختزال عباد الشمس لذلك يجب أن تترك في الحضان لفترة سبعة أيام تفحص خلالها كل ٢٤ ساعة للبحث عن التفاعلات الآتية : كما يظهر في شكل ٤٧ .

١- تفاعل حمضى Acid reaction

يتحول لون لبن عباد الشمس إلى اللون الأحمر وهو اختبار مثالى للبكتيرات المخمرة لسكر اللاكتوز Fermentative organisms .

٢- تفاعل قلوئى Alkaline reaction

يتحول لون لبن عباد الشمس إلى اللون الأزرق أو قرمزي والكثير من البكتيرات المحللة للبروتينات تظهر هذا التفاعل خلال ٢٤ ساعة الأولى .

٣- أختزال عباد الشمس Litmus reduction

تصبح المزرعة بيضاء اللون (أى عديمة اللون) ويحدث ذلك مع البكتيرات النشطة التكاثر حيث أنها تقلل القدرة التأكسدية الاختزالية للمزرعة .

٤- التخثر Coagulation أو التجبن

يتكون خثرة Curde حيث تتصلب البيئة وذلك نتيجة لتخثر البروتين - وأمالة الأنوبة ٤٥ درجة تبين ما إذا كان حدث تخثر من عدمه .

٥- هضم كازين اللبن أو البيتن Peptonization

عندما تفقد البيئة تماسكها ويصبح اللبن رائق ويتحول إلى اللون الاصفر (مثل لون المشمش أو القش) وهذا يتم نتيجة لفعل أنزيمات هضم البروتين . ولذلك أستغل هذا الاختبار في الأغراض التصنيفية .

التمرين الرابع والخمسون

- ١- حضر مزرعة عمرها ٢٤ ساعة من كل من البكتيريات الآتية :
Streptococcus lactis , *Bacillus subtilis* , *E.coli*
- ٢- جهز ٤ أنابيب من بيئة لبن عباد الشمس .
- ٣- لقح ٣ أنابيب كل بكائن من الكائنات السابقة . أترك الرابعة بدون تلقيح للمقارنة .
- ٤- ضع الأنابيب في الحضان على درجة ٣٧°م لمدة أسبوعين مع الفحص الدورى كل يومين بحثاً عن التغيرات التى تحدث للبيئة .
ويمكن تلخيص التغيرات التى يمكن حدوثها لبيئة اللبن فيما يلى:
- (أ) إنتاج أحماض أو قلويات : يتغير لون دليل عباد الشمس إلى اللون الأحمر فى الوسط الحمضى واللون الأزرق الغامق فى الوسط القلوى .
- (ب) التجبن : يكون التجبن حمضياً وذلك بتكوين خثرة حمضية لترسيب كازينات الكالسيوم الغروية نتيجة لتكوين الأحماض العضوية وفى هذه الحالة يتغير لون الدليل إلى الأحمر مع تكون شرش واضح بينما يتكون التجبن إنزيمياً وتتكون خثرة أنزيمية متماسكة وملساء (بارا كازينات الكالسيوم) نتيجة لأفراز أنزيم أو أنزيمات مماثلة للرنين Rennin بواسطة البكتيريات فى وجود أيونات الكالسيوم ولا يتغير فى هذه الحالة لون الدليل حيث تظل البيئة متعادلة .
- (ج) تكوين غازات: عند تكوين الغازات يحدث تثقيباً للخثرة المتكونة .
- (د) هضم كازين اللبن: Peptonization ويطلق على هضم وتحويل كازين اللبن غير الذائب وتحويله إلى مركبات ذائبة أسم Peptonization ويلاحظ ذلك بأن يصبح اللبن رائق لهضم الكازين وملون بلون أصفر (مثل لون المشمش أو القش).
- (هـ) اختزال صبغة عباد الشمس : ويستدل عليه فى اختفاء لون الدليل نتيجة لأختزاله بحيث تصبح البيئة عديمة اللون. ويبدأ الاختزال قرب قاع الأنبوبة.

وقد تشاهد حلقة حمراء باهتة اللون بين المنطقة المختزلة وغير المختزلة من البيئة .

الأكسدة البيولوجية Biooxidations

إن التفاعلات التي يطلق عليها الأكسدة البيولوجية يقصد بها تلك التفاعلات الأنزيمية المختصة بعمليات التنفس والتخمير .

إن الخلاف الأساسي بين البكتيريا الهوائية إجباراً Oxidative والبكتيريا الأخرى هو أن الأولى تحصل على الطاقة اللازمة لها عن طريق التنفس أما البكتيريا الأخرى فهي إما تحصل على طاقتها عن طريق التنفس أو عن طريق التخمير Fermentative .

التنفس Respiration

يمكن تعريف التنفس بأنه العملية الموفرة للطاقة والتي تعمل فيها المواد العضوية كمعطيات الكترونية وأن الأكسجين الجزيئي الحر يكون المستقبل الوحيد للألكترونات (أو للأيدروجين) والكائنات الهوائية تتميز بقدرتها على أكسدة المواد العضوية منتجة لغاز ثاني أكسيد الكربون والماء كناتج لعملية الأكسدة . وهذه القدرة على استعمال الأكسجين تكون مصحوبة باستغلال مجموعة من النظم السيتوكرومية .

والكائنات المخمرة Fermentative تستعمل المواد العضوية كمصدر للطاقة وينتج عن ذلك مواد قابلة للأكسدة أو الإختزال كناتج نهائي . وفي هذه الحالة تعمل المواد العضوية كمعطية وأيضاً مستقبلة للألكترونات وهذه النواتج النهائية قد تكون أحماض أو دهيدات أو كحولات - هذا وبعض الغازات مثل ثاني أكسيد الكربون والأيدروجين والميثان يمكن أن يشملها نواتج التخمير . ويمكن إذاً أن تعرف عملية التخمير بأنها عملية أكسدة بيولوجية للحصول على الطاقة والتي تعمل فيها المواد العضوية كمعطيات ومستقبلات للألكترونات (الأيدروجين) وكذلك ومن الملاحظ أن عمليات التخمير هذه لا تستعمل أو تستقبل أي نظم سيتوكرومية .

والسكريات وبخاصة الجلوكوز تعتبر المواد العضوية الأكثر أستغلالاً بواسطة البكتيريات المخمرة. إلا أن بعض المواد الأخرى مثل الاحماض العضوية، والأحماض الأمينية ، والبيورينات ، والبريميدينات يمكن لبعض البكتيريات أن تخمرها أيضا .

هذا والنواتج النهائية لعمليات التخمر تتحد تبعاً لطبيعة الكائن البكتيرى المخمر، ونوعية المادة المستعملة فى التخمر والظروف البيئية المصاحبة كالحرارة والحموضة أو القلوية .

ولما كانت عملية التخمر تتم تحت ظروف غير هوائية إلا أنه يجب أن نعلم أن الكائنات الاختيارية تغير من عملياتها الأيضية التى من شأنها أنتاج الطاقة عند وجود الهواء فقد لوحظ أن هذه الكائنات تكون مخمرة فى غياب الهواء ثم تتحول إلى كائنات تنفسية فى وجوده . إلا أنه هناك بعض الشواذ مثل الحال فى بكتيريات حمض اللاكتيك والتى تقوم بعمليات التخمر فى وجود الهواء. وهناك مجموعة من الاختبارات لدراسة الأكسدة البيولوجية .

١- اختبار إنتاج أنزيمات الأوكسيداز

إن اختبار إنتاج الأوكسيداز واحد من أهم الاختبارات المفرقة بين المجاميع البكتيرية . فمثلاً البكتيريات التابعة لعائلة *Enterobacteriaceae* تعتبر سالبة لهذا الاختبار ومعظم أنواع الجنس *Pseudomonas* تعتبر موجبة له وفيما يلى خطوات الاختبار :

التمرين الخامس والخمسون

١- لقح عن طريق التخطيط بيئة آجار الجلوكوز بالبكتيره

Pseudomonas aeruginosa ثم ضعها بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤

ساعة .

٢- أغمر سطح المزرعة لبعض المستعمرات بقليل من محلول اختبار الأكسيداز وهو عبارة عن محلول ١٪ من داي مثيل فينيلين داي أمين هيدروكلورايد Dimethyl phenylenediamine hydrochloride .
لاحظ أن مستعمرات الـ *Pseudomonas* الموجبة لهذا الاختبار تصبح وردية اللون ثم تتدرج لتصبح بنية ثم حمراء غامقة ثم سوداء شكل ٤٨ .

٢- اختبار إنزيمات dehydrogenases أو اختبار أزرق المثيلين .

التمرين السادس والخمسون

- ١- حضر مزرعة حديثة من البكتيره *E.coli* نامية في بيئة آجار مغذى .
 - ٢- علق النمو الناتج في ١٠ مل من الماء المقطر المعقم .
 - ٣- حضر أنبوبتين نظيفتين وضع بكل منهما ما يلي :
امل محلول ١٪ جلوكوز .
امل محلول ١٠ - ٤ من صبغة أزرق المثيلين .
امل محلول فوسفاتي منظم لـ pH (٧ pH) .
 - ٤- أضف إلى أحد الأنبوب ١ مل من معلق الخلايا في الماء المقطر - وفي الأنبوبة الثانية ١ مل من ماء مقطر ومعقم فقط للمقارنة .
 - ٥- ضع بسرعة ٢ مل من زيت البرافين فوق المخلوط بعد رجه جيدا .
 - ٦- ضع الأنبوب في حمام مائي على درجة ٣٧° م .
 - ٧- أحسب الوقت اللازم لإختفاء اللون الأزرق من الأنبوبة الأولى .
- إختزال لون صبغة أزرق المثيلين يرجع إلى نشاط إنزيمات الديهيدروجيناز في وجود مادة تفاعل عضوية وهي الجلوكوز وعادة يجرى هذا الإختبار بسرعة للتعرف على مدى تلوث اللبن بالميكروبات فكلما قل الوقت اللازم لإختزال الصبغة كلما دل ذلك على شدة تلوث عينة اللبن المختبر .

٣- اختبار الكاتاليز Catalase Production test

معظم الكائنات الهوائية إجباراً والهوائية اختياراً والتي تستعمل الأكسجين تنتج فوق أكسيد الأيدروجين وأستمرار وجودها ونموها في وجود هذا الناتج السام Antimetabolite يرجع إلى إمتلاكها إنزيم الكاتاليز الذي يحلل فوق أكسيد الأيدروجين .



ولقد كان معروفاً أن موت الكائنات غير الهوائية إجباراً وبخاصة أنواع الـ *Clostridium* عند تعرضها للأكسجين يرجع إلى تكون المادة الانتحارية (فوق أكسيد الأيدروجين) وفي غياب إنزيم الكاتاليز الذي لا تحتويه هذه الكائنات ولكن ثبت عدم صحة هذا الافتراض لأن البكتيريا المتحملة لتركيزات منخفضة من الأكسجين Aerotolerant والتي تفتقر أيضاً لإنزيم الكاتاليز لا تتسمم في وجود الأكسجين والبحوث الحديثة أثبتت أن المادة السامة المتكونة هي عبارة عن نوع معين (أصل حر نشط جداً Highly reactive free - radical) من الأكسجين O_2 يعرف بالـ Superoxide وهذا المركب يتحلل بواسطة أنزيمات فلافينية (فلافيوبروتين) تعرف بأسم Superoxide dismutase والتي تكسر هذا السوبر أوكسيد إلى ماء وأكسجين طبقاً للمعادلة التالية :



وهذا الأنزيم موجود في الكائنات الهوائية والمتحملة لضغوط منخفضة من الأكسجين Aerotolerant ولكن لا يوجد في الكائنات غير الهوائية إجباراً .

التمرين السابع والخمسون

- ١- حضر مزرعة حديثة بعمر ٢٤ ساعة وأخرى قديمة بعمر أسبوعين من كل من *E.coli* ، *Streptococcus lactis* .
- ٢- أغمر سطح المزرعة بكل انبوبة بكمية كافية من محلول ٣٪ فوق أكسيد أيدروجين .
- ٣- لاحظ تصاعد فقاعات من المزارع الحديثة نتيجة لإنطلاق غاز الأكسجين بفعل إنزيم الكاتاليز .

أختزال النترات :

الكثير من البكتيريا الاختيارية وبخاصة الـ (*Nitrobacter*) لها القدرة على إستعمال الأكسجين الموجود بالنترات حيث تعتبر الأخيرة مستقبل جيد للأيدروجين وبذلك تتحول النترات إلى نيتريت وهذا التفاعل يتحكم فيه أنزيم يعرف بأسم Nitrase .



وحيث أن وجود الأكسجين الحر يمنع أختزال النترات بالطريقة السابقة الذكر - فإن الكائنات المصاحبة للبكتيريا المختزلة للنترات تعمل على أستهلاك الأكسجين المحيط بالبيئة أولاً لتسمح للـ *Nitrobacter* بالعمل على أختزال

النترات ومن المستحسن عند إجراء اختبار اختزال النترات أن توفر ظروف غير هوائية وفيما يلي خطوات إجراء الإختبار :

التمرين الثامن والخمسون

- ١-جهز مزرعة حديثة النمو (٢٤ ساعة) من كل من:
E.coli, Bacillus subtilis
- ٢- لقح بكل من المزارع السابقة الذكر انبوبة من بيئة مرق النترات ثم أترك انبوبة ثالثة بدون تلقيح للمقارنة - ضع ٢مل زيت برافين فوق المخلوط .
- ٣- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة ثم أكشف عن النيتريت في المزارع الناتجة .

وبيئة مرق النترات تتكون من :

مستخلص لحم	٣ جم
بيبتون	٥ جم
نترات بوتاسيوم	١ جم
ماء معطر	١٠٠٠ مل

- ٤- انقل ٣مل من المزرعة من تحت الزيت إلى انبوبة نظيفة ثم أضف إليها ١مل من محلول A وهو عبارة عن حمض السلفونيك Sulphonic acid ثم ٢/١ مل من محلول B وهو عبارة عن داي ميثيل نافثال أمين Dimethyl Naphthal amine

- ٥- ظهور لون أحمر وردي يدل على وجود النيتريت Nitrite شكل ٤٩ والنتائج السلبية يجب أن تؤكد بأضافة محلول من سلفات الزنك - ووجود الزنك يعمل على اختزال النترات الموجودة غير المختزلة إلى نيتريت وهذه تتفاعل مع المحاليل الكاشفة المضافة وتكون لون أحمر.

تخمير الكربوهيدرات

تختلف البكتيريا اختلافا كبيرا فى قدراتها التخمرية للمواد الكربوهيدراتية فبعضها يمكنه أكسدة السكريات البسيطة مكونا حمض وغاز والبعض الآخر يخمر نفس السكر وينتج أحماضا فقط . فى حين أن البعض الآخر يكون غير قادر كلية على تخمير هذا السكر . والمعلومات الخاصة بقدرة الكائن البكتيرى التخمرية للسكريات أو المواد الكربونية المختلفة تعتبر هامة جدا للتعرف على البكتيريا وتصنيفها . والغرض من التمرين التالى إظهار قدرة البكتيريا على تخمر السكريات وأى من السكريات تخمر أو لا تخمر مع مراعاة تكوين أحماض أو غازات بصفة عامة وبصرف النظر عن نوعية هذه الأحماض أو الغازات - ويمكن الكشف عن الأحماض بأضافة دليل للـ pH - أما الغازات المتكونة يمكن تجميعها فى أنبوبة دورهام Durham التى توضع مقلوبة فى الأنبوبة التى يتم فيها التخمر حيث تتجمع بها الغازات الناتجة .

التمرين التاسع والخمسون

١- حضر مزارع حديثة النمو (٢٤ ساعة) نامية على بيئة آجار مغذى من البكتيريا الآتية :

E. coli , *Bacillus subtilis* , *Pseudomonas marginata* .

٢- حضر أنابيب دورهام محتوية على ٩مل من بيئة تخمر السكريات المكونة من مصدر نيتروجين غير عضوى مع دليل أزرق البروموثيمول Bromthymol blue (أنظر ملحق البيئات) أو من بيئة تخمر السكريات المكونة من مصدر نيتروجين عضوى والمضاف إليها دليل البروموكريزول الأرجوانى Bromocresol purple، وتعرف البيئة الأخيرة باسم قاعدة المرق القرمزى Purple broth base ثم ضع بداخل كل أنبوبة أنبوبة دورهام الصغيرة مقلوبة

(قد تختلف نتائج تخمر السكريات حسب نوع البيئة المستعملة وخاصة في حالة البكتيريات التابعة للجنس *Pseudomonas*).

٣- حضر محاليل من السكريات بتركيز ٢٪ والآتى بيانها بعد تعقيمها، بالترشيح أو باستعمال التعقيم البخارى المتقطع خاصة في حالة السكريات الثنائية: أرابينوز - جلوكوز - لاكتوز - سكروز - مالتوز

٤- أضف إلى البيئة بكل أنبوبة ١ مل من محلول السكر المعقم والمراد إختبار تخمره ليصبح تركيز السكر بالبيئة ٢, ٪ .

٥- لقح أنبوبتين من كل سكر من المزرعة المراد إختبارها .

٦- ضع الأنابيب بالحضان (٣٠°م) لمدة أسبوع أو أكثر .

٧- إفحص الأنابيب دوريا كل ٤٨ ساعة باحثا عن تغير لون البيئة إلى اللون الأصفر عند تكون أحماض وتجمع فقائيع غازية في أنابيب دورهام ، الصغيرة الداخلية عندما تتكون غازات (شكل ٥٠)

٨- دون نتائجك في جدول مناسب .

التخمر الحمضى المختلط Mixed acid fermentation

أختبار أحمر الميثيل Methy Red Test

إن الكثير من البكتيريات السالبة لجرام والتي تعيش في أمعاء الإنسان يمكن أن تميز بعضها عن بعض على أساس نواتج تخميرها للجلوكوز ونكشف عن ذلك باختبار أحمر الميثايل عندما تنمى في بيئة أحمر الميثيل - فوجس بروسكاور MR-VPmedium وأفراد الأجناس الآتية , *Salmonella* , *Proteus* , *Escherichia* , *Aeromonas* يمكنها أن تخمر الجلوكوز مكونة كميات كبيرة من حمض اللاكتيك وحمض الخليك وحمض السكسينيك وحمض الفورميك علاوة على غاز ثانى أكسيد الكربون والأيدروجين وكحول الأيثايل .

وتكسد هذه الأحماض بالبيئة من شأنه خفض قيمة pH إلى ٠,٥ أو أقل. فإذا أضيف للمزرعة أحمر الميثيل كدليل فإن المزرعة تتخذ اللون الأحمر

مباشرة شكل ٥١ مما يدل على أن الميكروب عبارة عن Mixed acid fermenter . وهذه الكائنات تعتبر منتجة للغازات بدرجة كبيرة لأن لها القدرة على إنتاج إنزيم Formic hydrogenylase. وهذا يدل أيضا على وجود حمض الفورميك بكميات قليلة .



إختبار فوجس بروسكاور

يجرى هذا الإختبار للكشف عن المركب المتعادل التأثير (أستيل ميثيل كربينول $\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH(OH)-CH}_3$ والذي يعرف أيضا باسم Acetoin) أى أن الإختبار يكشف عن وجود مادة متعادلة ، فإن وجدت هذه المادة كان الإختبار موجبا - والعكس صحيح .

هذا والأختبارات السالبة من اختبار أحمر الميثيل قد تبين أن الكائن المختبر ينتج بدلا من الأحماض كميات كبيرة من 2,3 butanediol وكمية كبيرة من كحول الإيثايل - والكثير من أنواع *Bacillus* , *Enterobacter* , *Aeromonas* , *Erwinia* , تفعل ذلك ، وإنتاج مثل هذه المواد غير الحمضية تعمل على عدم خفض قيمة pH بالدرجة التي يكشفها دليل أحمر الميثيل - ولا يوجد ما يدل على وجود مادة 2,3 butanediol إلا أن مادة acetoin (Acetyl methyl carbenol) وهى مادة أولية لتكوين 2,3 butanediol يمكن التحقق من وجودها باستعمال كاشف باريت Barritt's reagent وهذا الكاشف يتكون من الفانافثول + KOH الميثيل وعند إضافتها إلى مزرعة بعمر ٨ ساعات نامية في بيئة أحمر الميثايل - فوجس بروسكاور - ويسمح لها بعض الوقت لأن لون المزرعة يتحول إلى اللون الوردى أو الأحمر في حالة وجود Acetoin شكل ٥٢ . وحيث أن كل من 2,3 Butanediol , Acetoin تتواجد تباعا فإن الإختبار يمكن أن يكون كافيا للكشف عن المركبين . ويعرف هذا الإختبار كما سبق أن بينا بإسم Voges Proskaur test .

التمرين الستون

- ١- حضر مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من كل من *E.coli* , *Aerobacter aerogenes*
- ٢- حضر ٣ أنابيب بيئة فوجس بروسكاور - أحمر الميثايل (راجع ملحق البيئات) .

- ٣- لقح أنبوبة بكل مزرعة مع ترك الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح للمقارنة .
- ٤- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .
- ٥- بعد أنتهاء فترة التحضين أكشف عن مادة الأسيتايل ميثيل كاربينول بنقل ١مل من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة ثم أضف إلى الأنبوبة ٢/١ مل من محلول باريت (أ) Barritt A ، ٢/١ مل من محلول باريت (ب) Barritt B (أنظر ملحق المحاليل) . رج محتويات الأنبوبة وأتركها معرضة للهواء لمدة ٥ - ١٥ دقيقة. لاحظ تكون لون أحمر وردي بالأنبوبة ليدل على وجود مادة الأسيتايل ميثيل كاربينول (شكل ٥٢) .

- ملحوظة : في التفاعلات السلبية لا يحدث تلون بالأنبوبة لمدة ساعة إلا أنه قد يظهر لون وردي بعد ذلك نتيجة لتفاعل بوايد ، مع الألفانفتول .
- ٦- أكشف عن تكون أحماض بالمزرعة ، وذلك بأضافة عدة نقط من دليل أحمر الميثيل إلى ما تبقى من المزرعة لاحظ تكون لون أحمر غامق (رقم pH ٤،٦ أو أقل) إذا كان الاختبار موجباً (شكل ٥١) .

أختبار تكون حمض البيوتيرك

بعض الأنواع البكتيرية تتميز بأحداث تخمر بيوتيري للسكريات بمعنى أن حمض البيوتيرك Butyric acid ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) يكون ضمن المواد العديدة الناتجة عن تخمر سكر الجلوكوز أو غيره من السكريات وعادة يتم تكون هذا الحمض عند سيادة الظروف غير الهوائية . وقد تلوث مثل هذه البكتيرات اللبن محدثة به تخمرا مماثل يعرف بالتخمير البيوتيري .

التمرين الواحد والستون

- ١- حضر أنابيب من بيئة اللبن الفرز المضاف إليه البروموكريزول الأرجواني .
 - ٢- لقم أنبوبة بمزرعة حديثة من البكتيريا *Clostridium butyricum* وأنبوبة أخرى بالبكتيريا *E.coli* . احتفظ بأنبوبة ثالثة دون تلقيح للمقارنة .
 - ٣- أضف إلى كل أنبوبة كمية قليلة من مسحوق كربونات الكالسيوم .
 - ٤- صب كمية كافية من مزيج فاسبار المنصهر فوق سطح البيئة ثم أترك الأنابيب في وضع قائم ليتصلب مزيج فاسبار .
 - ٥- ضع الأنابيب بالحضان (٣٠°م) لمدة ٢-٤ يوم .
 - ٦- تخلص من طبقة الفاسبار وذلك بتسخين الأنبوبة قليلاً مقابل المزيج المتصلب ثم أنزع الكتلة المتصلبة بواسطة أبرة التلقيح .
 - ٧- لاحظ لون ورائحة البيئة. تغير لون الدليل إلى اللون الأصفر. وظهور رائحة تشبه رائحة الزبد المترنخ تدل على وجود حمض البيوتيرك .
- إختبار تكوين كحول الإيثايل :**

قد يمثل كحول الإيثايل وثنائي أكسيد الكربون أهم ناتج لتخمير السكريات عن طريق بعض الكائنات الحية الدقيقة كما في حالة الخميرة . أو قد يكون واحداً من النواتج العديدة لتخمير السكريات بواسطة كثير من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى مثل بعض البكتيريا كبكتيريا القولون . وتستغل هذه الظاهرة في بعض الصناعات الغذائية كإنتاج المشروبات الكحولية وإنتاج الكحول .

التمرين الثاني والستون

- ١- حضر مزارع عمرها أسبوع من الكائنات الحية الآتية :
Saccharomyces cerevisiae , *E.coli* النامية في بيئة مرق خلاصة المولت .
- ٢- إختبر في المزرعة لوجود كحول الإيثايل بنقل ٥مل من المزرعة (يراعى عدم رج المزرعة) إلى أنبوبة نظيفة. أضف إليها ٤ نقط من محلول NaOH ١٠٪ ثم أضف عدة نقط من محلول اليود المركز (راجع ملحق المحاليل). لاحظ تكون راسب أصفر من اليود وفورم CHI_3 في حالة وجود كحول الإيثايل.

إذا لم يتكون الراسب مباشرة يمكن تسخين المخلوط إلى درجة ٦٠°م لمدة دقيقة ، إذا لم يتكون الراسب بعد ذلك فإن ذلك دليل على غياب كحول الإيثايل من المزرعة .

تحلل الأسكيولين Aesculin hydrolysis

التمرين الثالث والستون

- ١- حضر بيئة الأسكيولين وهي تحضر كالاتى :أضف إلى ١٠٠مل مرق الببتون ١ ، ٠ جرام من الأسكيولين و ٠,٥ جرام سترات الحديدك وتوضع فى أنابيب وتعقم فى الأتوكلاف على ١١٥°م لمدة ١٠ دقائق .
- ٢- لقح أنابيب بيئة الأسكيولين وتحضن الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة بالبكتيره المختبره .
- ٣- الكائن الذى يحلل الاسكيولين يودى إلى تلوين البيئة بالون الأسود .
وتحلل الإسكيولين يتم بواسطة إنزيم B-glucosidase .

إنتاج مادة مختزلة من السكروز

Production of reducing substance from sucrose

التمرين الرابع والستون

- ١- حضر بيئة تتكون من ١٠ جرام بيتون و ٥ جرام مستخلص لحم و ٤٠ جرام سكروز و ١٠٠٠مل ماء . وتعبأ فى أنابيب وتعقم فى الأوتوكلاف .
- ٢- لقح الأنابيب التى تحتوى على بيئة السكروز السابق تجهيزها بالكائن البكتيرى المراد اختباراه وتحضن المزارع لمدة ٤٨-٧٢ ساعة .
- ٣- بعد التحضين أضف إلى ٢مل من المزرعة إلى ٢مل من محلول بندكت فى أنبوبة اختبار . ضع الأنبوبة فى ماء يغلى لمدة ١٠ دقائق .
- ٤- ظهور لون أصفر إلى بنى يدل على أن الاختبار موجب وتكونت مادة مختزلة من السكروز .

إنتاج ٢ - كيتوجلوكونات : Production of 2- Ketogluconate

التمرين الخامس والستون

- ١- حضر بيئة سائلة مكونة من تريبتون ١٥ ٪ ، ومستخلص خميرة ١ ٪ ، وفوسفات بوتاسيوم أحادية الإيدروجين ١ ٪ ، وجلوكونات الكالسيوم ٤ ٪ . تعبأ البيئة في دوارق مخروطية ٥٠ مل من البيئة لكل دورق وتعقم في الأتوكلاف .
- ٢- لقح البيئة في الدوارق بلقاح من مزرعة حديثة من البكتيره وتحضن المزارع عند ٣٠ م° وتختبر لإنتاج ٢- كيتوجلوكونات بعد ٥ أو ١٠ يوم بإتباع الطريقة الآتية:

التمرين السادس والستون

- ١- أضف ١٠ مل من محلول بندكت إلى ١ مل من المزرعة .
- ٢- سخن في حمام مائي (١٠٠ م°) لمدة ١٠ دقائق .
- ٣- برد بسرعة وتترك ١٢ ساعة . إنتاج راسب يرتقالي أو بني يدل على أن الإختبار موجب .

إنتاج الليفان Levan production

التمرين السابع والستون

- ١- حضر بيئة آجار مغذى مضاف إليها ٥ ٪ سكروز .
- ٢- صب بيئة آجار السكروز في أطباق بترى معقمة. وبعد تصلب البيئة تلحق بطريقة التخطيط البسيط بلقاح مخفف من الكائن البكتيري المراد إختباره . وتحضن الأطباق لمدة ٤٨ ساعة .
- ٣- إذا ظهرت المستعمرات بلون أبيض وتكون مخاطية شديدة التحذب يكون دليلاً على إنتاج الليفان .

التعرف على الأنواع البكتيرية

Identification of Bacterial Species

بعد عزل كائن بكتيري ما في مزرعة نقية فإنه يمكن تحديد نوعه وذلك عن طريق مجموعة من الدراسات تشمل الصفات الظاهرية للخلايا Morphological characteristics والصفات المزرعية Cultural characteristics والأختبارات الفسيولوجية Physiological tests ، علاوة على اختبار القدرة المرضية Pathological properties للكائن المعزول .

وبعد الحصول على نتائج هذه الدراسات والأختبارات تسجل في لوحة تصنيف البكتيرات. وبالرجوع إلى صفات البكتيرات الأخرى الشبيهة والتي سبق دراستها ووصفها وتصنيفها وتسميتها، يمكن تعيين نوع المزرعة النقية المجهولة، ويمكن التعرف على السلالة المجهولة بمقارنتها بسلالة معلومة وتحسب درجة التشابه أو التطابق مع صفات السلالتين بتقدير معامل يطلق عليه معامل التشابه Similarity coefficient طبقاً لمعادلة سنيث Sneath التي يتجاهل فيها الإختبارات ذات النتائج السلبية والمشاركة بين السلالتين التي تحت المقارنة. وفي هذه المعادلة يحسب عدد الأختبارات الإيجابية المشتركة بين كل من السلالتين مقسوماً على مجموع الصفات أو الأختبارات في كلا السلالتين :

$$\text{معامل التشابه} = \frac{أ}{أ + ب + ج}$$

أ = عدد الصفات أو الأختبارات الإيجابية النتائج المشتركة بين السلالتين تحت المقارنة .

ب = عدد الصفات أو الأختبارات الإيجابية النتائج الخاصة بأحد السلالتين .

ج = عدد الصفات أو الأختبارات ذات النتائج الإيجابية الخاصة بالسلالة الأخرى .

ويفضل احتساب معامل التشابه كنسبة مئوية ويطلق عليها حينئذ Similarity index فعندما تكون قيمته ١٠٠٪ فإن ذلك يعنى تطابق تام بين السلالتين وعندما تكون القيمة صفر٪ يعنى عدم وجود تشابه إطلاقاً .

وهناك معامل آخر يعرف بأسم معامل المضاهاة Matching coefficient وفيه يؤخذ في الاعتبار عدد الاختبارات أو الصفات السلبية النتائج ومن أهم المراجع التي يرجع إليها في هذا الصدد هو مرجع Bergey .

أستعمال مرجع بيرجى

إن مرجع بيرجى Bergey's manual for Determinative Bacteriology هو المرجع الوحيد المعتمد للتعرف على البكتيريات ، وبالرغم من أنه يشمل وصف لكل البكتيريات المعروفة إلا أنه هناك العديد من البكتيريات التي ستضم إليه بالمستقبل - وهذا المرجع في طبعته حالياً (الطبعة التاسعة) هي ناتج مجهود ١٣١ عالم ينتمون إلى ١٥ دولة .

وقد تولى هيئة التحرير تسعة من العلماء تولوا تنظيم وتجميع المعلومات التي أشتمل عليها .

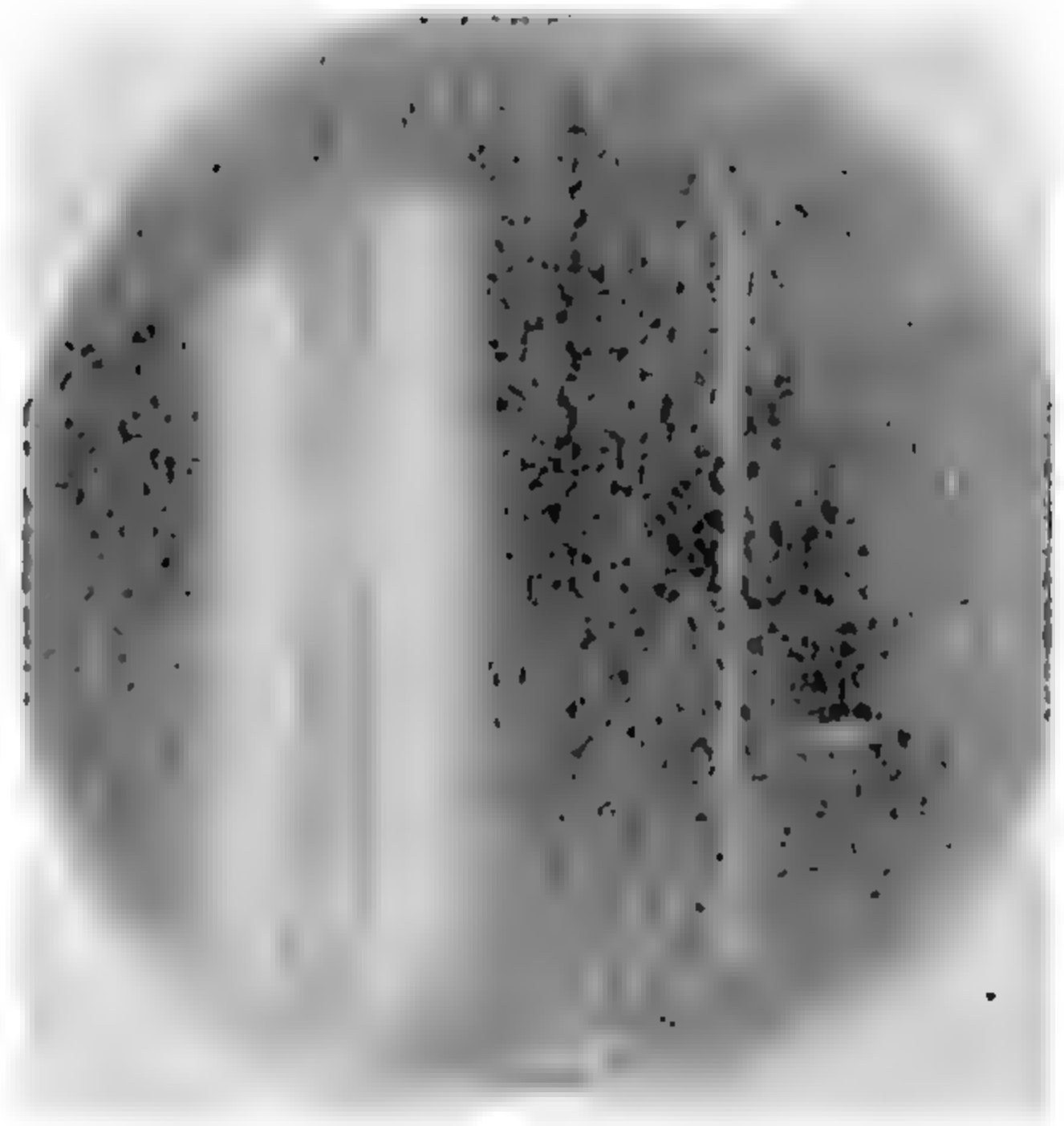
نظام الأجزاء The Parts System

وحيث أن البكتيريات لم تترك تسجيلات حفزية (Fersil records) التي يمكن الاستعانة بها في الدراسات الفيلولوجينية (أى التي ترجع إلى الأصول والأجداد) لذا فإن تقسيم البكتيريات تم على أسس واقعية وليس على أسس تطورية . والأسس الأخيرة هي التي مكنت علماء النبات وعلماء الحيوان من تقسيم وتصنيف النباتات والحيوانات .

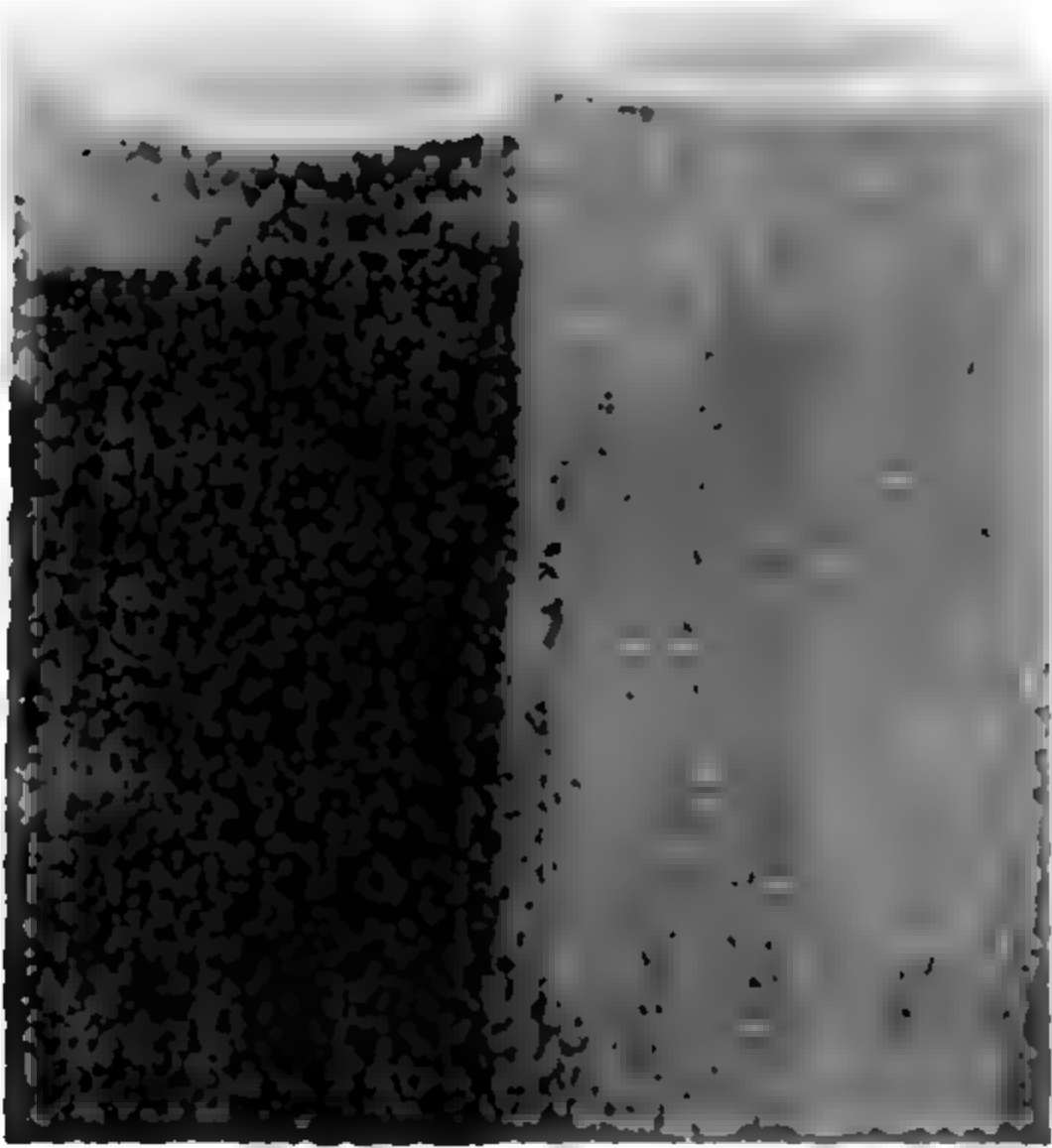
وفي الطبعة السابعة من مرجع بيرجى قسمت البكتيريات والتي وضعت في صف Schizomycetes إلى عشرة رتب كل رتبة قسمت إلى عائلات وكل عائلة إلى أجناس - وفي العائلات الكبيرة تم تقسيمها إلى قبائل - وقد كان هذا نظام مرتب ومريح - إلا أن الأسس التي صنفت عليها الرتب لم تكن ذات مدلولات حقيقية حيث من غير المعروف لها أى ارتباطات تطورية . ولهذا السبب فقد فكر مؤلف مرجع بيرجى في طبعاته الثامنة والتاسعة إيجاد طريقة



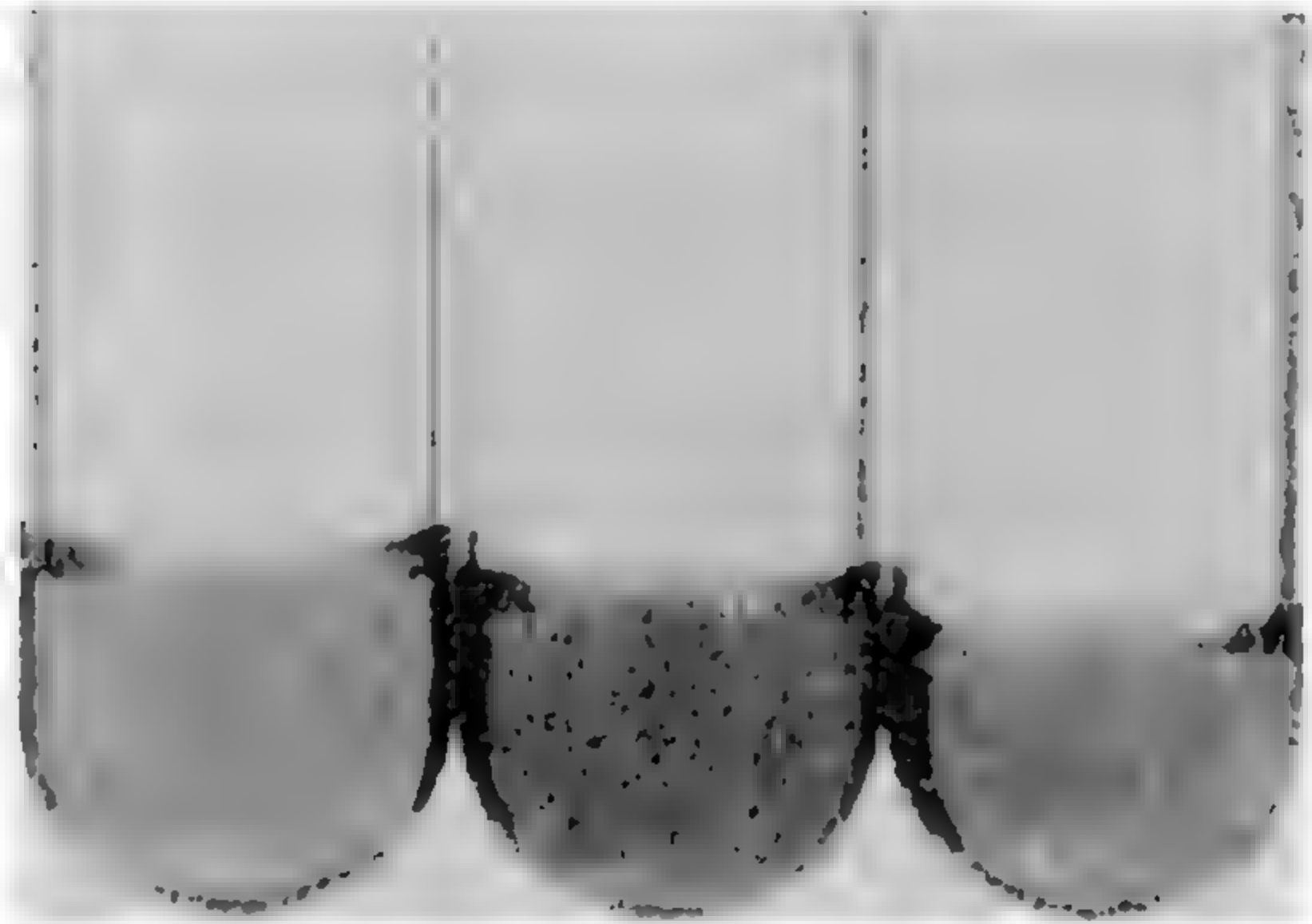
شكل ٤٣ : إختبار تحلل الكازين .
المناطق الرائقة حول خط الدقيق التي
الى اليسار تدل على تحلل الكازين
مانياً .



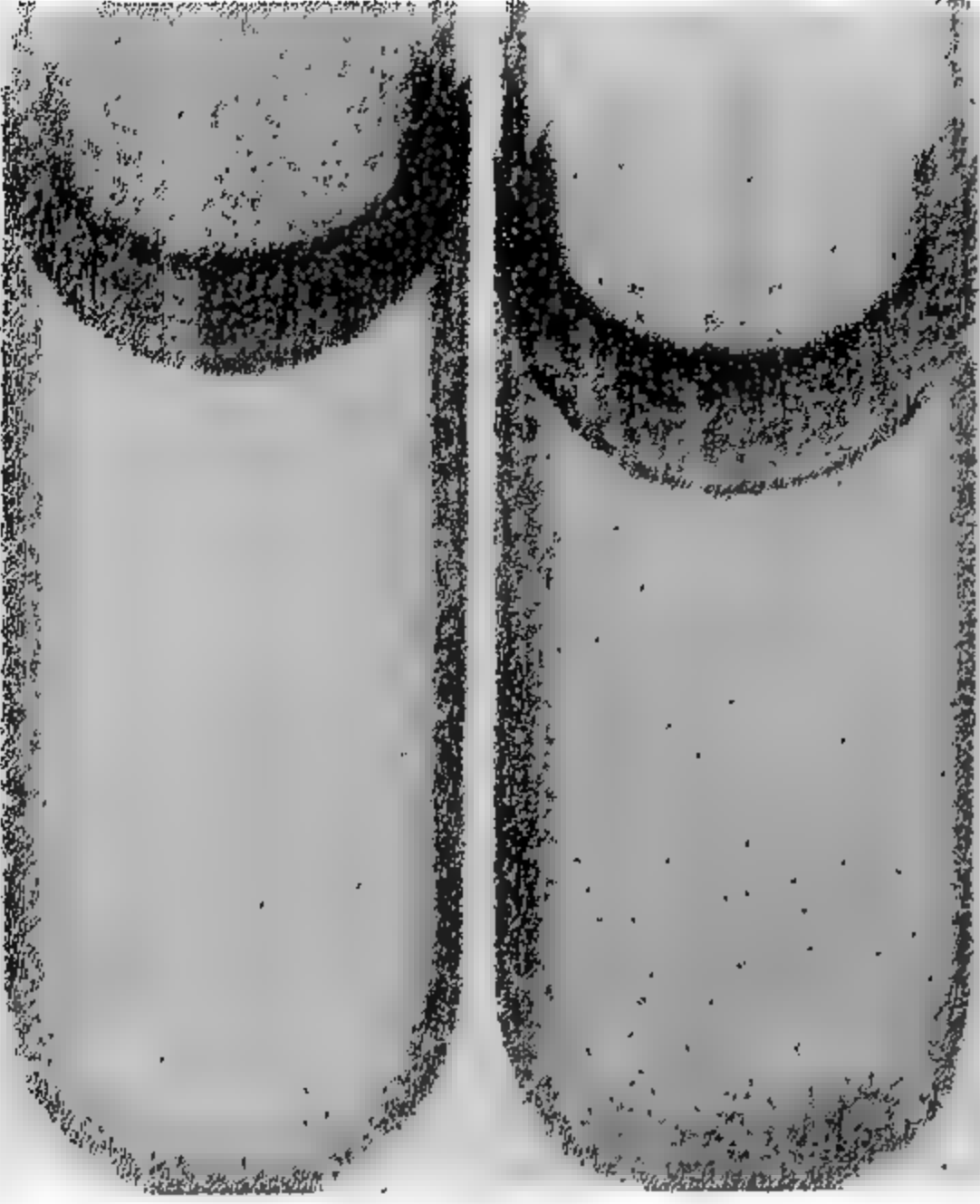
شكل ٤٢ : إختبار تحلل النشا .
المناطق الرائقة بجوار خط التلقيح تدل
على تحلل النشا مانياً .



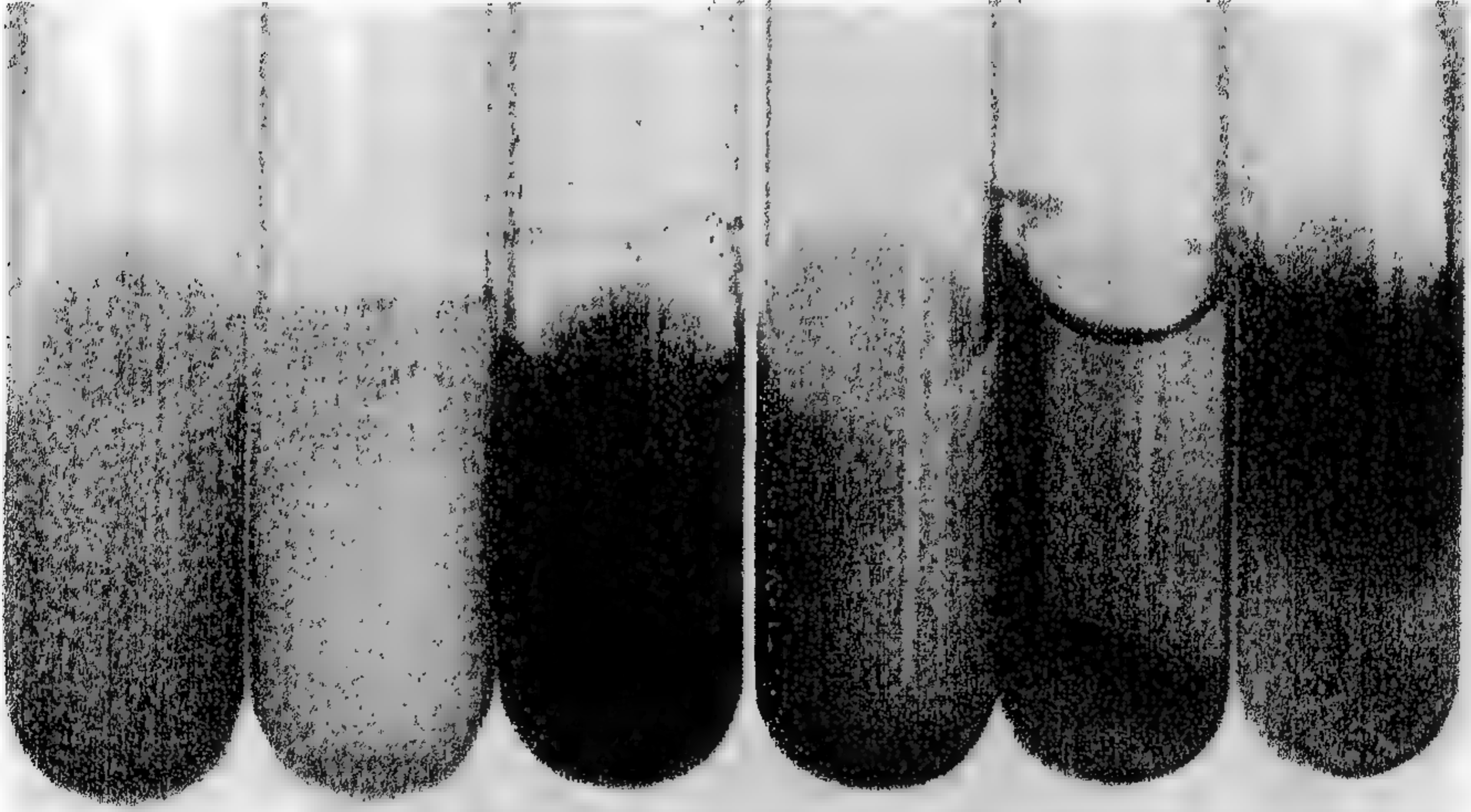
شكل ٤٥ : إنتـاج
كبريتور الأيدروجين ، الإنبوبة على
اليسار موجبـه (Prouteus) - الإنبوبة
الأخرى سالبة .



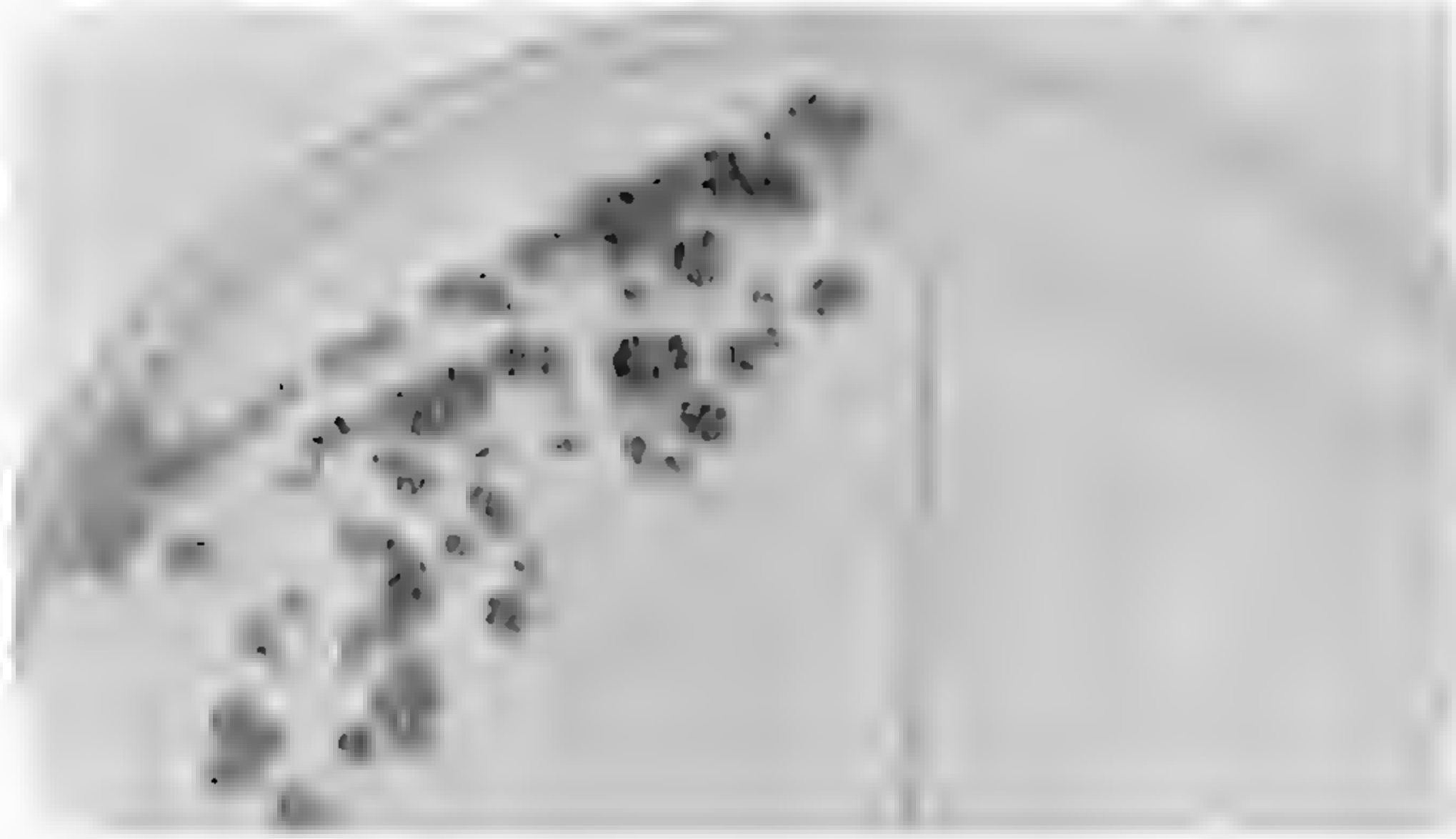
شكل ٤٤ : إختبار اليورياز (من
اليسار الى اليمين) إنبوبة غير ملقحة
- إنبوبة ملقحة (Prouteus) موجبـه
- إنبوبة سالبة .



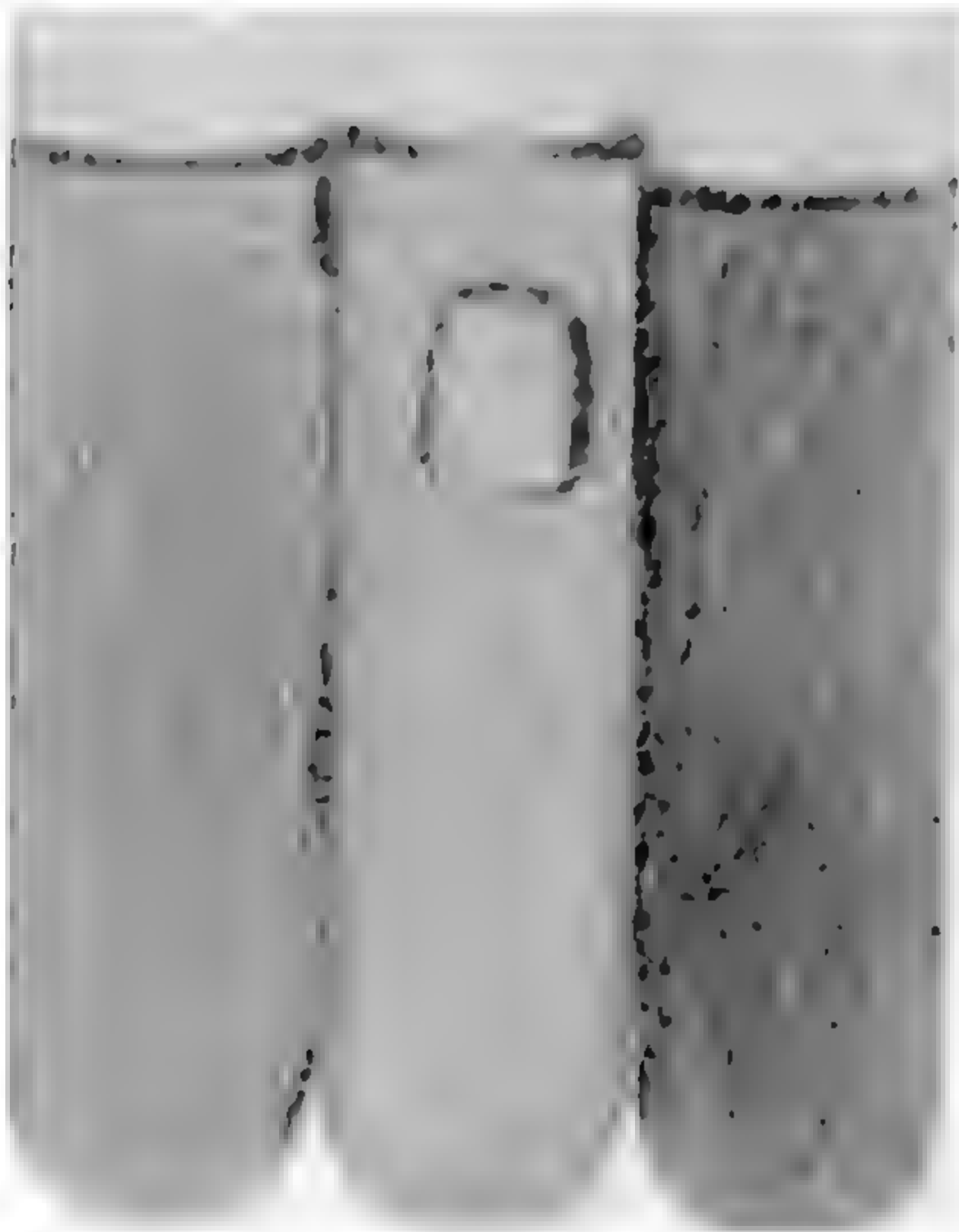
شكل ٤٦ : اختبار الإندول،
الإنبوبة الى اليسار يدل على
اختبار موجب نتيجة لتلقيحها
بالبكتيرة *E.coli* وإلى اليمين
اختبار سالب (ملقحه ببكتيرة
أخرى لا تنتج الإندول).



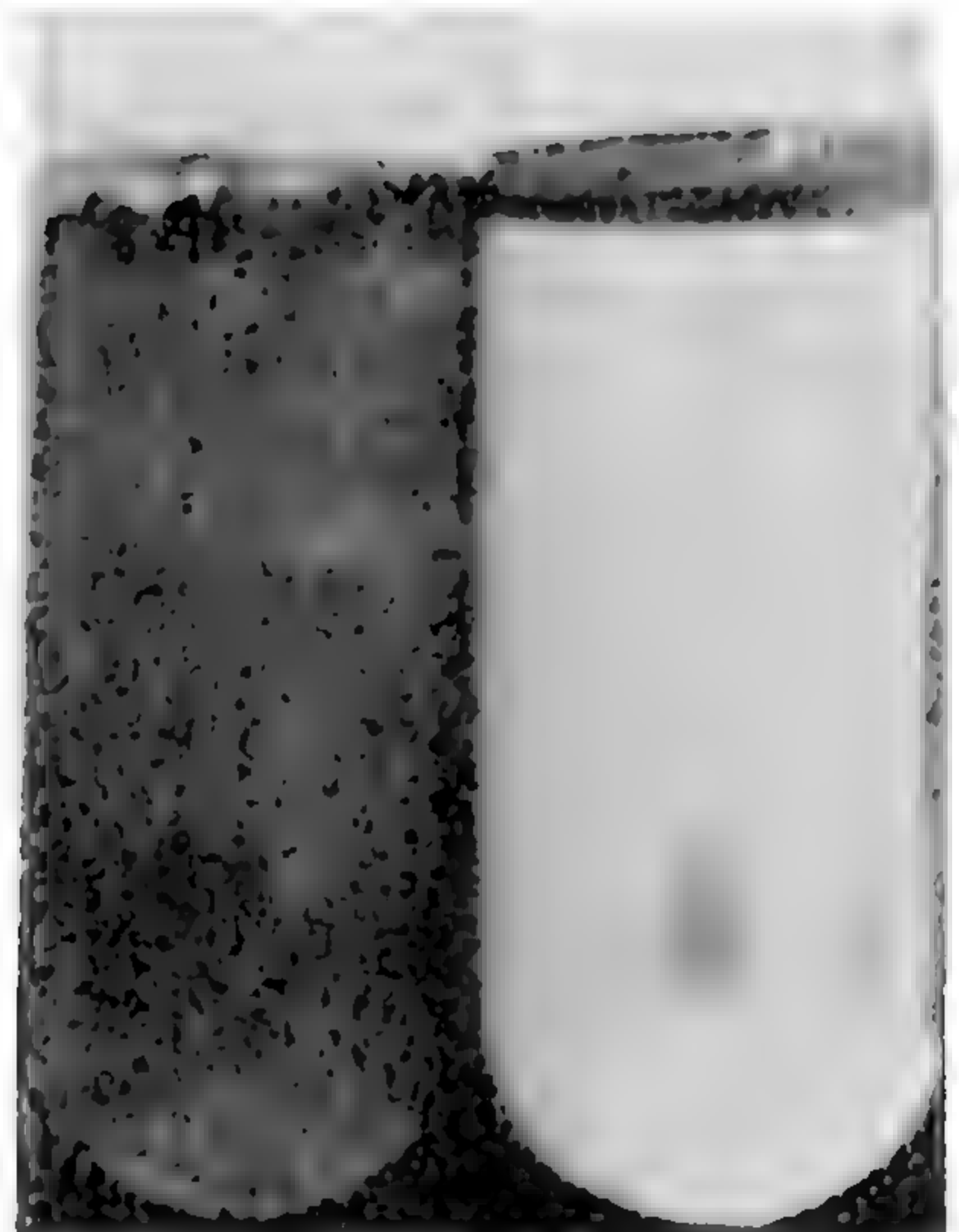
شكل ٤٧ : التفاعلات في بيئة لبن عباد الشمس من اليسار الى اليمين تفاعل قلوى-
من اليسار (١) تأثير قلوى مع بعض البيبتة، (٢) تأثير حمضى، (٣) تأثير قلوى شديد
مع بعض البيبتة، (٤) بيئة لبن بدون تغير، (٥) بيبتة مع تكون خثره، (٦) بيبتة مع
تكون راسب أصفر.



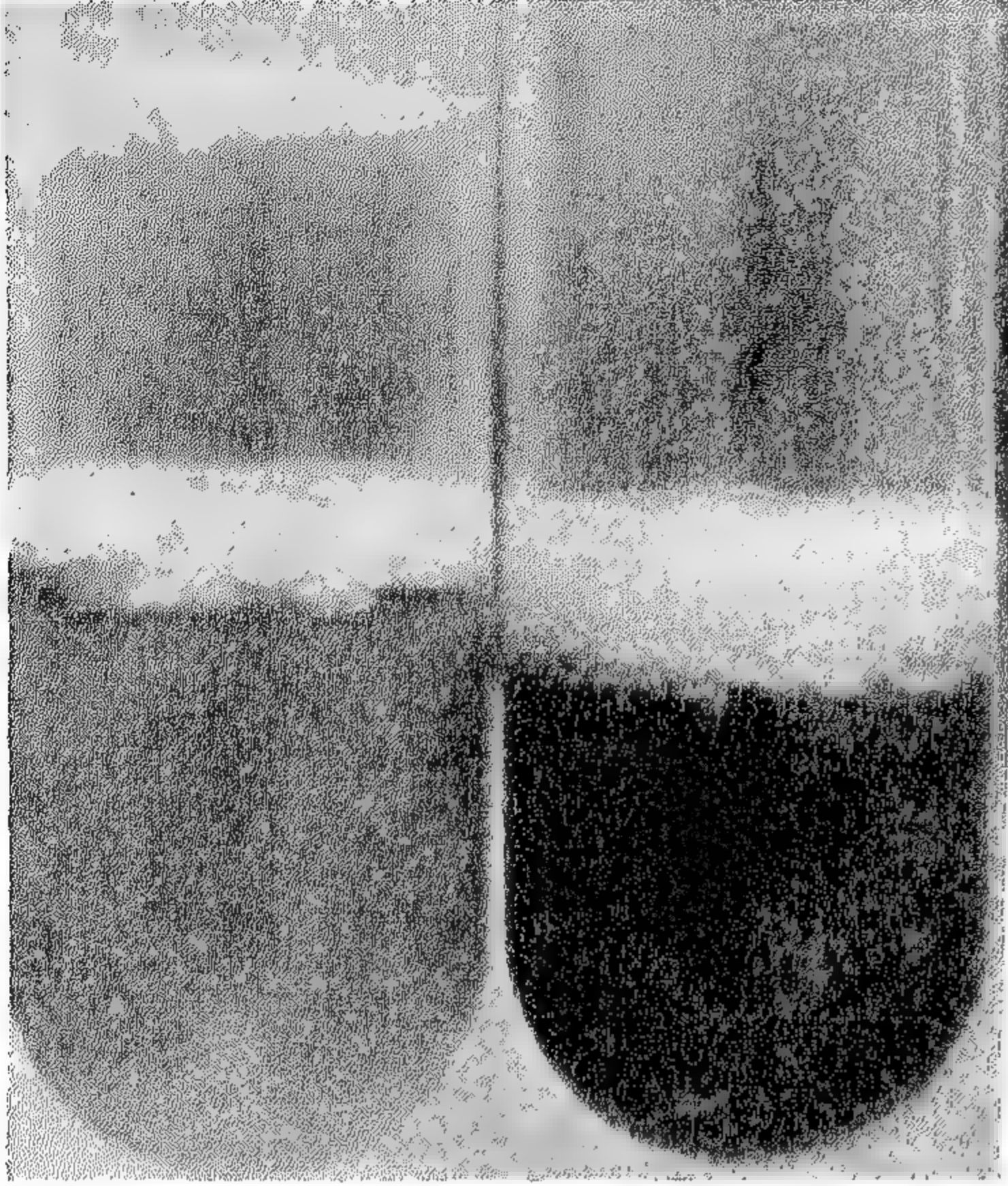
شكل ٤٨: اختبار
الأوكسيـــــــــداز -
المستعمرات التي الى
اليسار تبين اختبار
موجب والتي الى اليمين
تبين اختبار سالب .



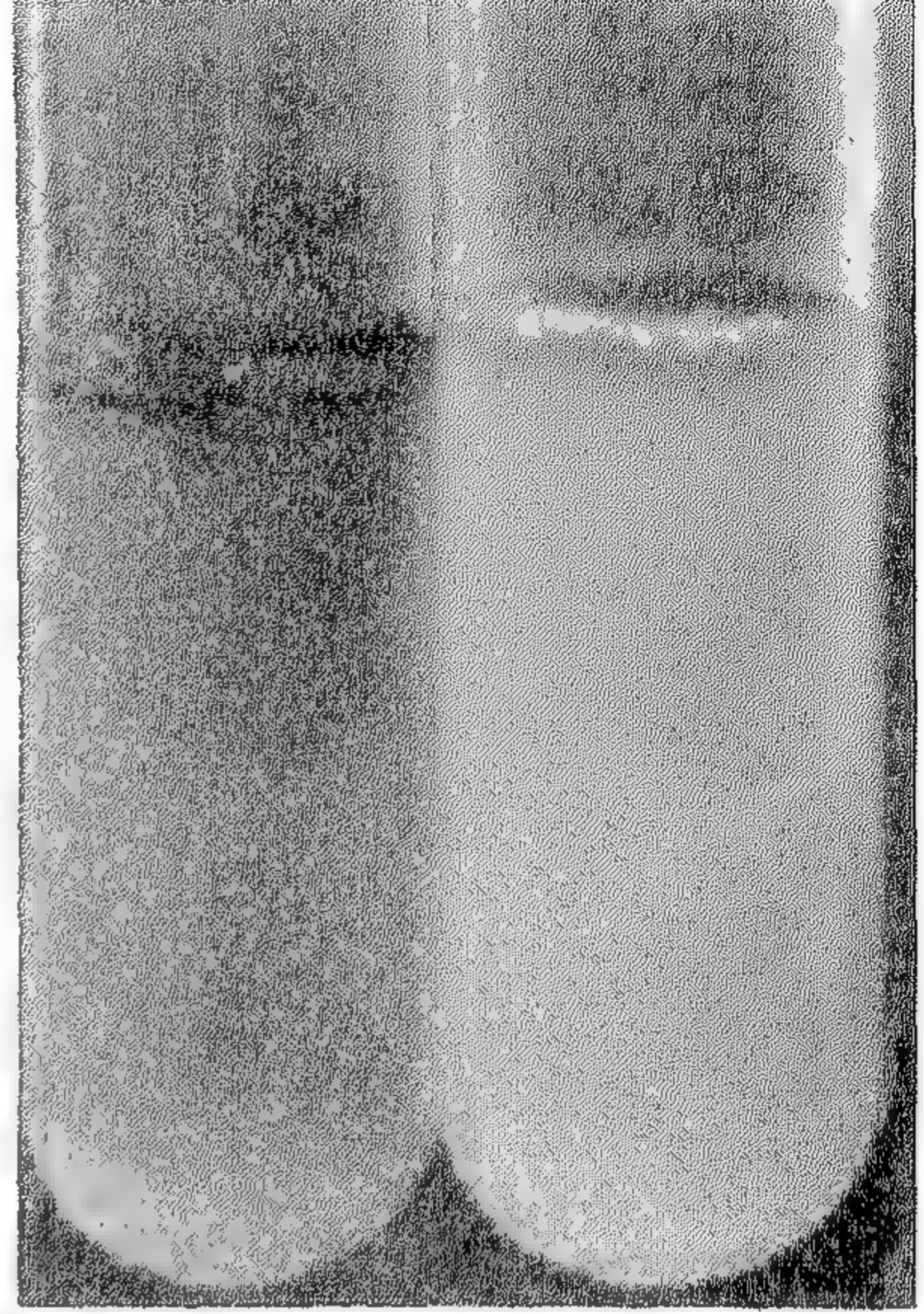
شكل ٥٠: اختبار بلمر السكريات من
اليسار الى اليمين - إنبوبة غير ملقحة -
إنبوبة ملقحة بالبكتيره *E.coli* (اختبار
موجب) - إنبوبة ملقحة ببكتيره أخرى
(اختبار سالب) .



شكل ٤٩: اختبار النترات - الى
اليسار إنبويه تبين اختبار موجب
والى اليمين إنبويه تبين اختبار
سالب .



شكل ٥٢: اختبار فوجس بروسكاور
الإنبوبة الى اليسار تبين اختبار موجب
والتي الى اليمين تبين اختبار سالب.



شكل ٥١: اختبار أحمر الميثيل -
الإنبوبة الى اليسار تبين اختبار
موجب والتي الى اليمين تبين اختبار
سالب.

للتقسيم سهلة وميسرة دون أن يكون لها علاقات تطورية وبذلك فقد قاموا بتقسيم البكتيريات إلى تسعة عشر جزء Part ونتيجة لذلك فإن معظم الرتب العشرة فى الطبعة السابعة قد أسقطت فى حين أن بعض الرتب مثل , Actinomycetes , Myxobacteriales , Mycoplasmatales قد أبقى عليها- كما أسقطت أيضاً بعض العائلات وأدخل بعض عائلات أخرى جديدة :

فالجزء الأول أحتوى على البكتيريات الممثلة للضوء Phototrophic

الجزء الثانى أحتوى على البكتيريات المنزلقة Gliding

الجزء الثالث أحتوى على البكتيريات المغلفة Sheathed وهكذا

ومن المسلم به أنه بعد أن يحصل الدارس على معلومات عن صفات الكائن المورفولوجية والفسىولوجية فإنه من الممكن التعرف على إنتسابه لأى من الأجزاء التسعة عشر - وهناك عدة طرق تستعمل للتعرف على الجنس وهذه الأجزاء التسعة عشر . فيمكن للدارس أن يتتبع المفتاح المذكور فى المرجع من صفحاته الأولى أو أستعمال ما يعرف Skerman's Key والمفتاح المذكور فى صفحتى ١٩،١٨ من مرجع بيرجى يعتمد على الأحتياجات الغذائية للكائن ويجب أن يكون الباحث على المام بما تعنيه المصطلحات التالية :- Phototroph (أى الكائن الذى يعتمد على الضوء كمصدر وحيد للطاقة) ، Chemotroph (الكائن الذى يعتمد على التفاعلات الكيميائية للحصول على الطاقة) ، Chemoethotroph (الكائن الذى يستعمل ثانى أكسيد الكربون كمصدر رئيسى للكربون ويحصل على الطاقة من أكسدة المواد العضوية) ، Chemo-organotroph (الكائن الذى يستعمل المواد العضوية كالجلكوز والأحماض الأمينية كمصدر للكربون). وفى معظم الكائنات يكون مصدر الكربون هو نفس مصدر الطاقة والأخيرة تعرف Chemoheterotroph وهذا المفتاح يقود إلى التعرف على الجزء الذى ينتمى إليه الكائن المجهول .

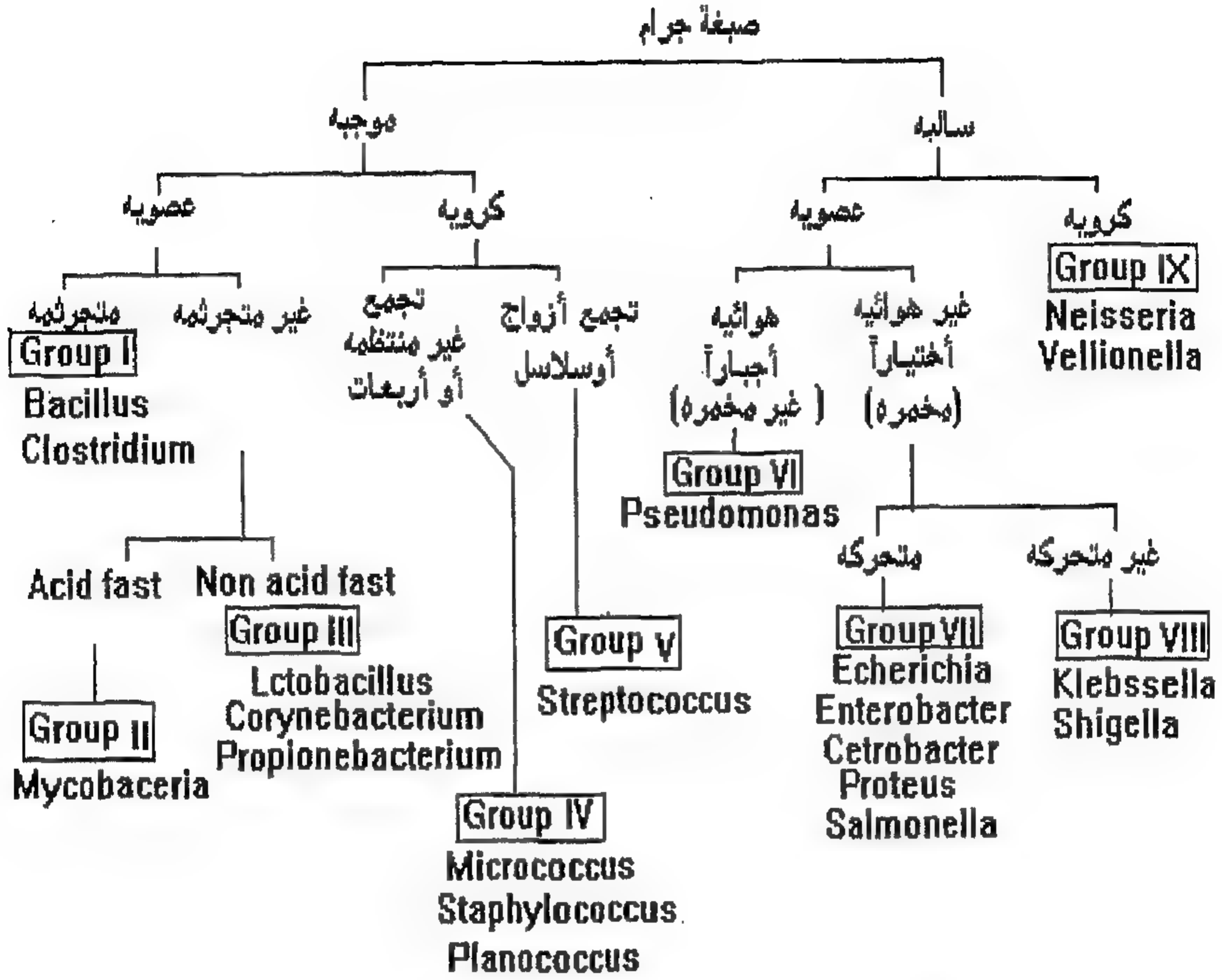
ويجب أيضا أن تعرف طريقة التعرف على تحت الاقسام Subdivision. وحيث أن كل جزء Part يختلف عن الآخر في طريقة تقسيمه إلى وحدات أصغر . فبعض الأجزاء مثل الجزء الثانى يحتوى على رتب وعائلات وأجناس والأجزاء الأخرى مثل الجزء الرابع تحتوى فقط على أجناس - وللتفرقة بين الأجناس يتطلب إجراء اختبارات إضافية .

مفتاح سكيرمان Skerman's Key

طريق آخر للتعرف على الجنس هو استعمال مفتاح سكيرمان وهذا المفتاح يعطى نتائج جيدة إذا ما توفرت الصفات المورفولوجية والفسولوجية للكائن المجهول ، هذا وغياب أدنى صفة قد تؤثر تأثيراً كبيراً على النتائج وتؤخر التعرف على الجنس .

طرق التفريق Separation outlin procedure

وبالرغم من أن هذه الطريقة مبنية على الصفات المدرجة فى مرجع بيرجى إلا أنه أكثر دقة وشمولا - فهي تشمل معظم الأجناس الشهيرة .



التعرف على الأجناس :

بالنظر إلى الشكل السابق تبين لنا لماذا نبدأ بالصفات المورفولوجية، فنحن نرغب أولاً التعرف على تفاعل صبغة جرام ، وهل الكائن كروي أم عصوي وما هو نوع التجمع - وهل الكائن متجرثم أو غير متجرثم ، وإذا كان الكائن المجهول موجب لجرام ولا يكون جراثيم نود أن نعلم هل الكائن موجب للصبغ المقاوم للأحماض أم لا، كما نود أن نعرف هل هو متحرك أو غير متحرك وبالأستمرار في البحث نجد أنه لازماً علينا التعرف على الصفات المزرعية وبهذا يمكننا التعرف على واحد من التسعة مجاميع الموجودة في الشكل السابق والمشار إليها بالأرقام الرومانية [I - IX] .

وإذا أريد التفرقة بين الأجناس فما علينا إلا أن تدرس الصفات الفسيولوجية.

التعرف على الأنواع :

بعد أن تتعرف على الجنس فمن الضروري التعرف على النوع - فإذا كان الجنس يحتوى على واحد أو اثنين من الأنواع فإن الاختيار يكون بسيط - إما إذا كان الجنس يحتوى على عديد من الأنواع مثل الأجناس *Mycobacterium* , *Bacillus* , *Pseudomonas* فإن التعرف على النوع يقتضى المزيد من الدراسات الفسيولوجية والسيرولوجية والحيوية - كما هو موضح بلوحة التعرف الآتية

لوحة التعرف على نوع البكتيره

أسم الباحث.....	مصدر العزل
تاريخ العزل	رقم العزل
الشكل الظاهرى للخلايا الخضرية النامية على بيئة.....على م° بعد..... يوم	

شكل وتجمع الخلايا الخضرية	حجم الخلايا
وجود أو غياب الجراثيم الداخلية	حجم وموضع الجراثيم
أختبار الحركة	الصبغ بطريقة جرام
صبغ الأسواط	الصبغ المقاوم للأحماض

شكل المستعمرات النامية على بيئة.....على م° بعد..... يوم		
الشكل	الارتفاع	الحافة
السطح	الصفات الضوئية	

النمو على الآجار المائل على بيئة.....على م° بعد..... يوم		
كمية النمو	الشكل	القوام
تكوين الصبغة	الرائحة	

النمو فى بيئة المرق المغذى على م° بعد..... يوم

النمو السطحي نمو تحت السطح

الراسب الكمية

تخمر المركبات الكربونية في بيئة على م°

سكريات أحادية : أرابينوز رامنوز زيلوز جلوكوز

فركتوز جالاكتوز مانوز

سكريات ثنائية : لاكتوز سكروز مالتوز

عديدة السكر : رافينوز نشا دكسترين جليكوجين

كحولات : جليسرين مانيتول سوربيتول

جلوكوسيدات : ساليسين Aesculin

علاقة النمو بالأكسجين الجوى اختبار الكاتاليز اختزال النترات

..... اختبار الأندول إنتاج كبريتور الإيدروجين تحلل الجيلاتين

..... تحلل اليوريا تحلل النشا اختبار فوكس بروسكاور وأحمر

الميثيل النمو في بيئة لبن عباد الشمس

درجة الحرارة المثلى للنمو م° درجة الـ pH المثلى للنمو

درجة الحرارة الصغرى م° درجة الـ pH الصغرى

درجة الحرارة القصوى م° درجة الـ pH القصوى

العلاقة الحيوية : ممرضة للإنسان ممرضة للحيوان ممرضة

للنبات مترمة ذاتية التغذية علاقات أخرى

أختبارات أخرى

التطفر Mutagensis

إن الاتجاه التجريبي نحو دراسة الوراثة بالبكتيريا كان دائماً موجهاً إلى دراسة قدرة البكتيريا على التطفر ، وذلك للتعرف على منشأ الطفرات ومسبباتها وتأثيرها على المجاميع البكتيرية .

ومن أهم النتائج التي أسفرت عنها هذه الدراسة إظهار أن التصنيفات الوراثة التي تحدث للخلايا البكتيرية ترجع إلى التطفر، والطفرات هي عبارة عن تغييرات تلقائية غير موجهة قد تحدث في المصمات (المحددات) النووية للصفات الوراثة . وتعتبر الطفرة حدث نادر وتظهر غالباً على معدل يتراوح بين 10^{-1} إلى 10^{-10} لكل خلية بكتيرية لكل جيل. وهذا يعنى أن خلية واحدة من كل ١٠٠٠٠ خلية أو خلية واحدة من كل ١٠ بليون خلية تكون عرضة للتطفر.

وهناك أنواع كثيرة من الطفرات منها الطفرات المقاومة للفيروس البكتيري أو المقاومة للمضادات الحيوية أو الإشعاعات الضارة أو الطفرات الكيموحيوية والتلوينية والطفرات المختلفة في القدرة المرضية ، أو تلك التي تؤثر على الشكل الظاهري للمستعمرات في معظم الأنواع البكتيرية (ناعمة (S)Smooth خشنة (R)Rough ومخاطية (M)Mucoid) .

ويفضل في مثل هذه الدراسات الوراثة التأكد من نقاء المزارع الطفرية المستعملة وذلك بعزل خلية واحدة فردية Single cell isolation ويجرى ذلك بالاستعانة بالميكروسكوب المجهز بأجهزة خاصة بالميكرومانيبولاتور

Micromanipulators غير إنه توجد طريقة ميكروسكوبية لا تعتمد على أجهزة خاصة لعزل الخلايا الفردية قد أتبعها De Vay and Schnathorst سنة ١٩٦٣ وتتم هذه الطريقة باتباع الخطوات الآتية :

التمرين الثامن والستون

- ١- نعلم حواف شريحة بقلم شمع .
- ٢- يفرد ٥, - ١, ٠ مل من زيت البارافين (المعقم) فوق سطح الشريحة في صورة طبقة رقيقة . (الشمع الموجود على حواف الشريحة يمنع الزيت من التساقط من على سطح الشريحة) .
- ٣- حضر معلق مخفف جداً من المزرعة (١, مل يخفف مرتين أو ثلاث مرات في ١٠ مل ماء معقم) . واسحب كميته بسيطه منه بواسطة أنبوبة شعريه معقمه بعد أن توصل بأنبوبة من المطاط يسحب منها المعلق .
- ٤- بواسطة الأنبوبة الشعرية الدقيقة إدفع فقائيع صغيرة (٥٠ ميكروليتر) Micro-bubbles إلى طبقة زيت البارافين . وتلاحظ هذه العملية باستعمال شبيئات ذات تكبير بسيط (٥, ٣ أو ٥ X) .
- ٥- تفحص الفقائيع الصغيرة باستعمال شبيئات تكبيرها ٤٠ X .
- ٦- الفقائيع التي تحتوى على خلايا مفردة تسحب بواسطة أنبوبة شعريه اخرى معقمة ثم تفرغ على سطح بيئة مناسبة لزراع البكتيريات . عادة يسحب بعض من الزيت مع النقطة ، لذلك يفضل أن تخطط النقطة الصغيرة المتساقطة على سطح الآجار .

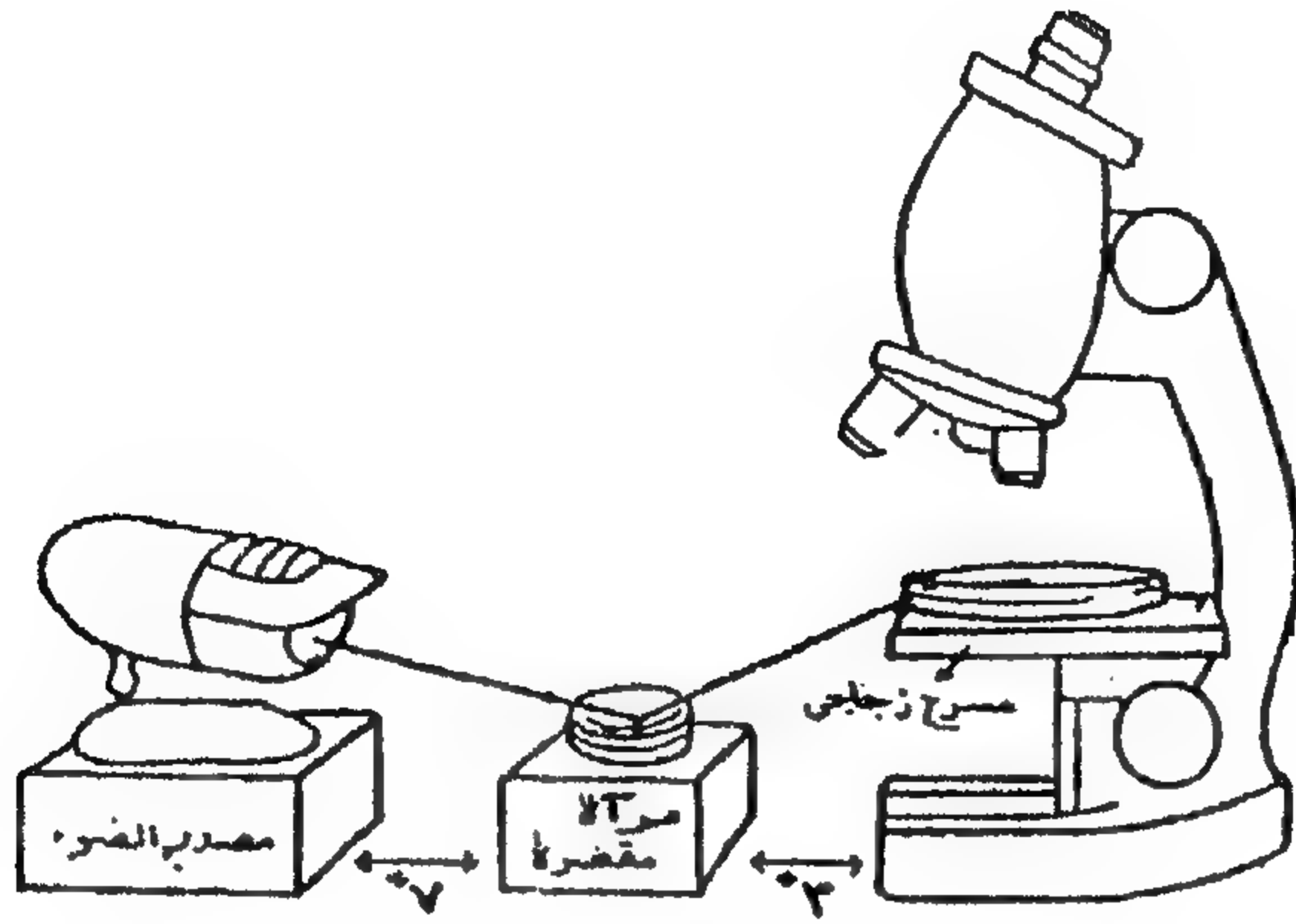
٧- فى خلال ٣-٤ أيام ستظهر مستعمرة صغيرة Micro colony على سطح الآجار ناشئة عن خلية مفردة .

عزل الطفرات المختلفة فى صفاتها المزرعية :

قد يشاهد بالمزرعة ذات المستعمرات المتشابهة اختلاف فى واحد أو أكثر من هذه المستعمرات فى المظهر العام المميز للمزرعة . وقد يظن كثير من الفاحصين أن مثل هذه المستعمرات المختلفة ترجع إلى تلوث المزرعة واختلاطها بغيرها . ولكن فى كثير من الأحيان تكون هذه المستعمرات المختلفة فى صفاتها المزرعية نتيجة للتطفر . والتمرين التالى يهدف إلى التأكد من ثبات الشكل الظاهرى لمستعمرات نوع معين من البكتيريات .

التمرين التاسع والستون

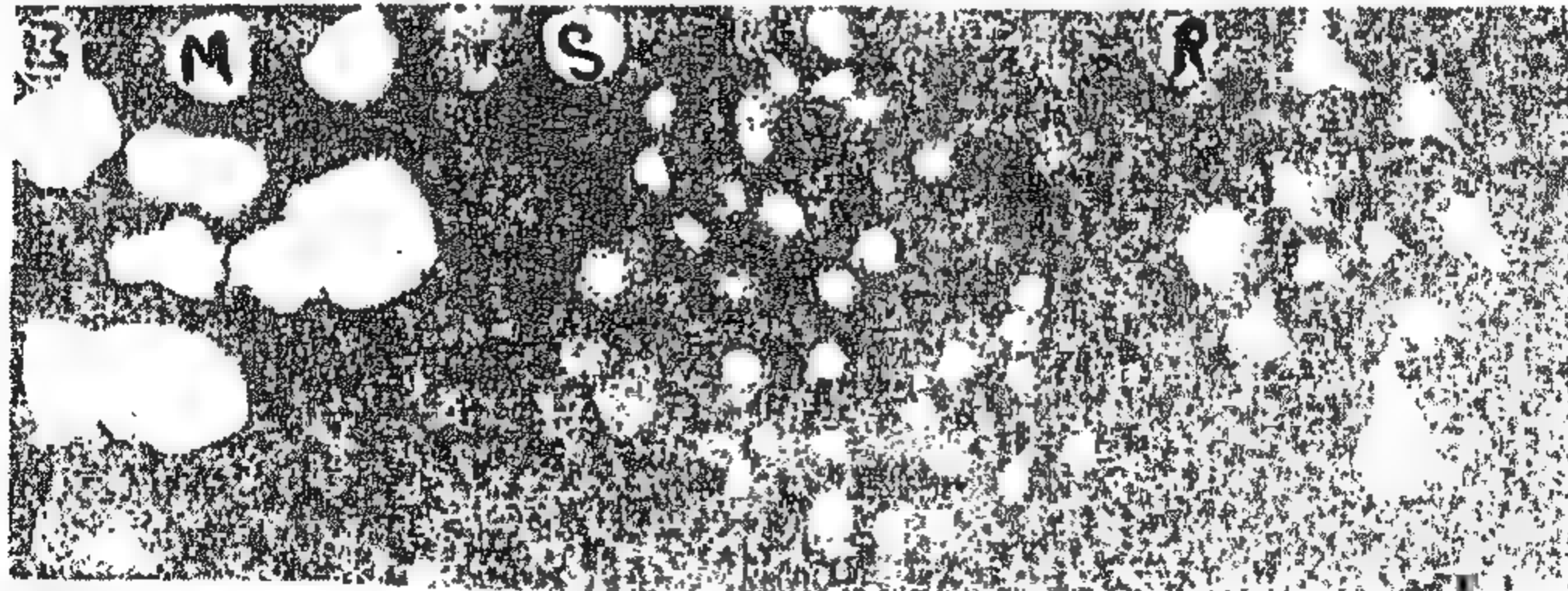
- ١- صب أطباق بيئة آجار السكروز (آجار مغذى + ٥% سكروز)
- ٢- لقح خمسة أطباق منها بمعلق مخفف من مزرعة لم يسبق تجديدها وخمس أخرى بمعلق من مزرعة قديمة سبق تجديدها عدة مرات من البكتيره *Erwinia amylovora* وذلك بطريقة التخطيط البسيط .
- ٣- ضع الأطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٧٢ ساعة .
- ٤- إفحص المستعمرات النامية فى الأطباق بالعين المجردة ثم باستعمال مجهر تشريح له زوج من العدسات العينية Binocular dissecting microscope مع جعل الأضاءة تنفذ خلال المستعمرات بطريقة مائلة Obliquely transmitted كما هو مبين (بشكل ٥٣) .



شكل ٥٣ : كيفية الحصول على الضوء المائل لغرض فحص المستعمرات البكتيرية .

٥- صف المستعمرات الناتجة في كل حالة، لاحظ أن مستعمرات المزرعة التي لم يسبق تجديدها دائرية ، محدبة لامعة، زبدية القوام، ويسمى هذا النوع من المستعمرات بالناعمة (smooth(s)، أما المستعمرات الناتجة عن مزارع قديمة سبق تجديدها عدة مرات فإنه علاوة على النوع السابق من المستعمرات يظهر نوعين آخرين (أ) مستعمرات خشنة (Rough(R) وتتميز بأنها ذات حافة غير منتظمة وذات مظهر حبيبي مجعد جاف .

(ب) مستعمرات مخاطية (Mucoid(M) تتميز بأنها دائرية شديدة التحدب لزجة لامعة (شكل ٥٤) .



شكل ٥٤ : مستعمرات ناعمة (S) وخشنة (R) ومخاطية (M) من البكتيريا *Erwinia*

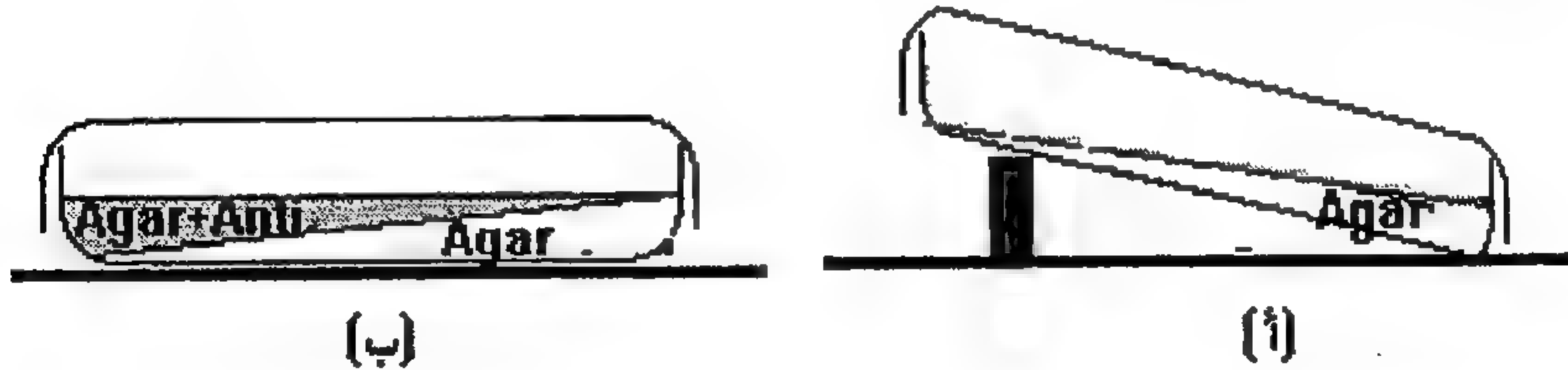
amylovora كما تشاهد بالعين المجردة .

عزل طفرات مقاومة للمضادات الحيوية :

تسبب الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية مشاكل خطيرة فى علاج الأمراض الميكروبية بواسطة المضادات الحيوية. وغالبا ما يؤخذ إحتمال حدوثها فى الاعتبار عند تحديد العلاج . وهناك عدة طرق لعزل الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية من مزارع البكتيريات أو من العينات التى تعزل من جسم الإنسان أو الحيوان المصاب ، نذكر منها طريقة الطباق المتدرج Gradient plate technique وخطوات هذه الطريقة تتلخص فيما يلى :

التمرين السابعون

- ١- صب ١٠ مل من بيئة الآجار المغذى المسال (٤٥° م) .
- ٢- يترك الآجار ليتصلب بالطبق وهو فى وضع مائل بوضع أحد جانبيه الطباق على قطعة من الخشب حتى يكون هذا الجانب مرتفعا عن الجانب الآخر أثناء تصلب الآجار (شكل ٥٥ - ١) .



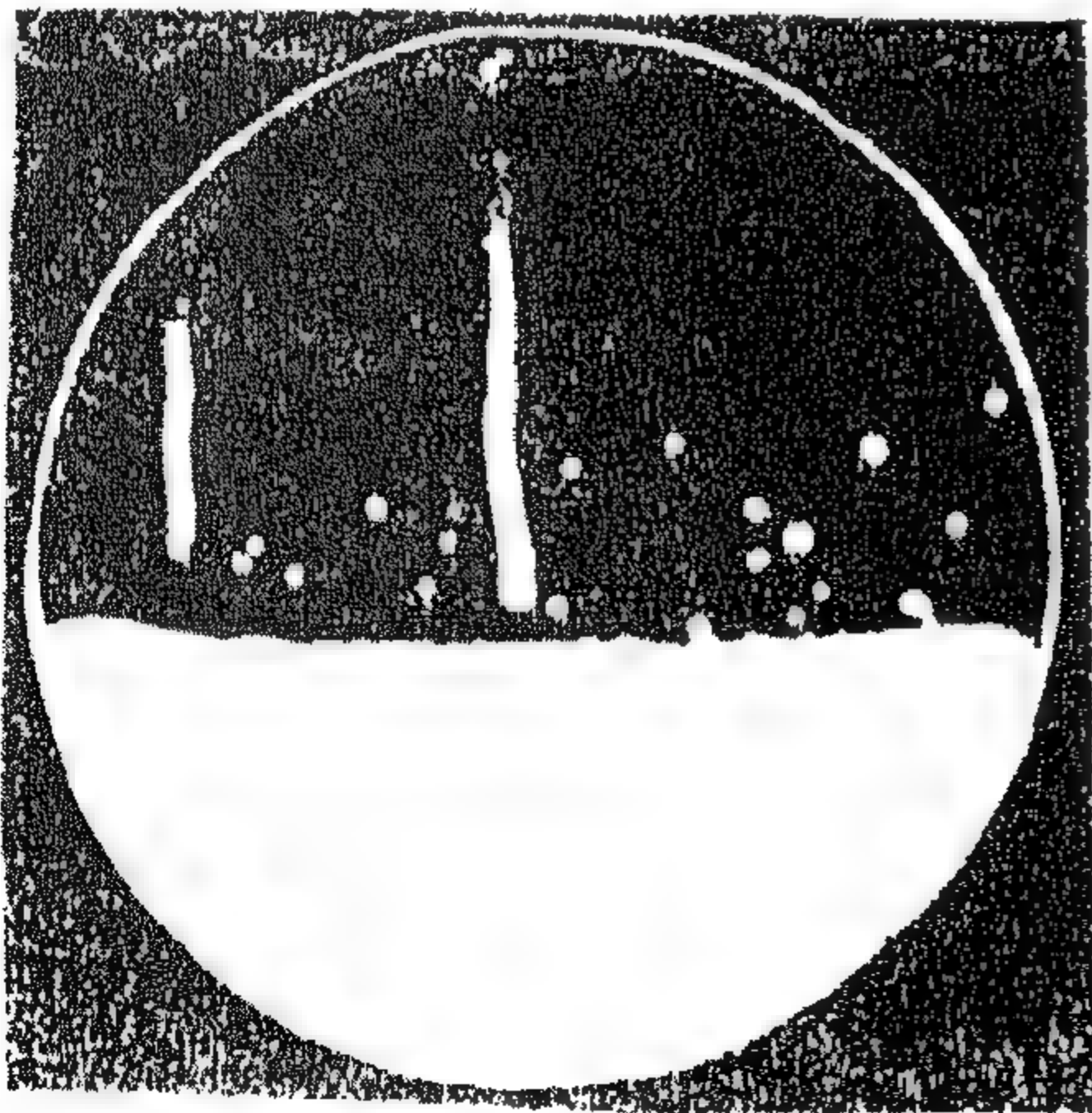
شكل ٥٥ : خطوات تحضير بيئة ذات التركيز المتدرج

- ٣- لقم كمية ١٠ مل من بيئة الآجار المغذى المسالة (٥٠° م) بكمية ١، مل مزرعة البكتيره *E.coli* النامية فى المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة والمضاف إليها ستربتوميسين بنسبة ٤٠٠ ميكروجرام/مل من البيئة (يلاحظ إضافة المضاد

الحيوى إلى البيئة وهى على درجة ٥٠°م حتى لا تتأثر فاعلية المضاد الحيوى من الحرارة المرتفعة) ثم يصب الآجار الملقح بنفس الطبق وتترك البيئة لتتصلب بالطبق وهو فى وضع أفقى تماما (شكل ٥٥ - ب) .

٤- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة ثم أفحص ما يظهر على سطح الآجار من نموات . ويبين (شكل ٥٦) ما يمكن أن يلاحظ . (حيث أن المضاد الحيوى بطبقة الآجار العلوية سوف ينتشر إلى طبقة الآجار السفلية الخالية من المضاد الحيوى وأن درجة الانتشار سوف تؤدي إلى تخفيف تركيز المضاد الحيوى فى الطبقة العليا . ويتوقف التخفيف على نسبة سمك طبقتى الآجار العليا إلى السفلى ، لذلك فإن تركيز المضاد الحيوى سيكون متدرجاً بالطبق) .

٥- فى حالة ظهور مستعمرات مفردة بعيدا عن المنطقة ذات النمو المتزاحم فإن ذلك دليل على أن خلايا هذه المستعمرات المفردة مقاومة للتركيزات المرتفعة من المضاد الحيوى. وللتأكد من ذلك يفرد نمو بعض هذه المستعمرات تجاه التركيزات الأكثر ارتفاعا بالطبق ، ثم يترك الطبق بالحضان لمدة ١٨ ساعة أخرى يفحص بعدها، وجود نمو مستمر على امتداد خط الفرد يدل على أن هذه المستعمرة ناتجة عن نمو طفرة مقاومة للتركيزات المرتفعة من المضاد الحيوى (شكل ٥٦) .



شكل ٥٦: نمو طفرات من البكتيره *E.coli* على طبق متدرج التركيز من المضاد الحيوى .

عزل الطفرات المختلفة في قدرتها المرضية :

باستمرار زرع البكتيره *Pseudomonas solanacearum* (المسببة لمرض العفن البنى في البطاطس) على البيئات الصناعية فإن ذلك يؤدي إلى إضعاف قدرتها المرضية للنبات أو إلى ضياع هذه القدرة نهائيا. ويعزى ذلك إلى أن المزرعة الأصلية ذات القدرة الممرضة المرتفعة Virulent تظهر بها طفرات غير قادرة على إحداث المرض Avirulent وأن هذه الطفرات يزداد تعداد أفرادها في المزرعة على حساب السلالة الأصلية لتحملها ظروف المزرعة غير الملائمة أكثر من السلالة الأصلية الممرضة وكذلك لقدرتها على إحداث تثبيط في نمو السلالة الممرضة. وقد تمكن كلمان Kelman في سنة ١٩٥٤ من إيجاد طريقة تسهل التمييز بين السلالات الممرضة وغير الممرضة من هذه البكتيره بالزرع على بيئة التيترازوليم التفريقية .

ويلاحظ أن أملاح التيترازوليم Tetrazolium ذائبة في الماء وعديمة اللون وعندما تختزل تتحول إلى مواد ملونة غير ذائبة وهي الفورمازان Formazans وعلى ذلك فإن اختزال التيترازوليم يدل على نشاط الأنزيمات المزيلة للأيدروجين Dehydrogenases وقد وجد كلمان أن السلالات الممرضة تظهر بيضاء اللون أو ذات مركز محمر وغير الممرضة تظهر بلون أحمر مع حافة شفافة .

التمرين الحادى والسبعون

- ١- صب أطباق من بيئة التيترازوليم التفريقية (آجار مغذى + ٢٪ جلسرين + ٠.٠٠٥ ٪ Triphenyl tetrazolium chloride) .
- ٢- لقح بعض من الأطباق بمعلق مخفف من مزرعة حديثة العزل من نبات مصاب ولم يسبق تجديدها ومجموعة أخرى من الأطباق من مزرعة قديمة سبق تجديدها عدة مرات من البكتيره *P. solanacearum* وذلك بطريقة التخطيط البسيط .

٣- ضع الأطباق في الحضان (٣٠° م) لمدة ٤٨ ساعة .

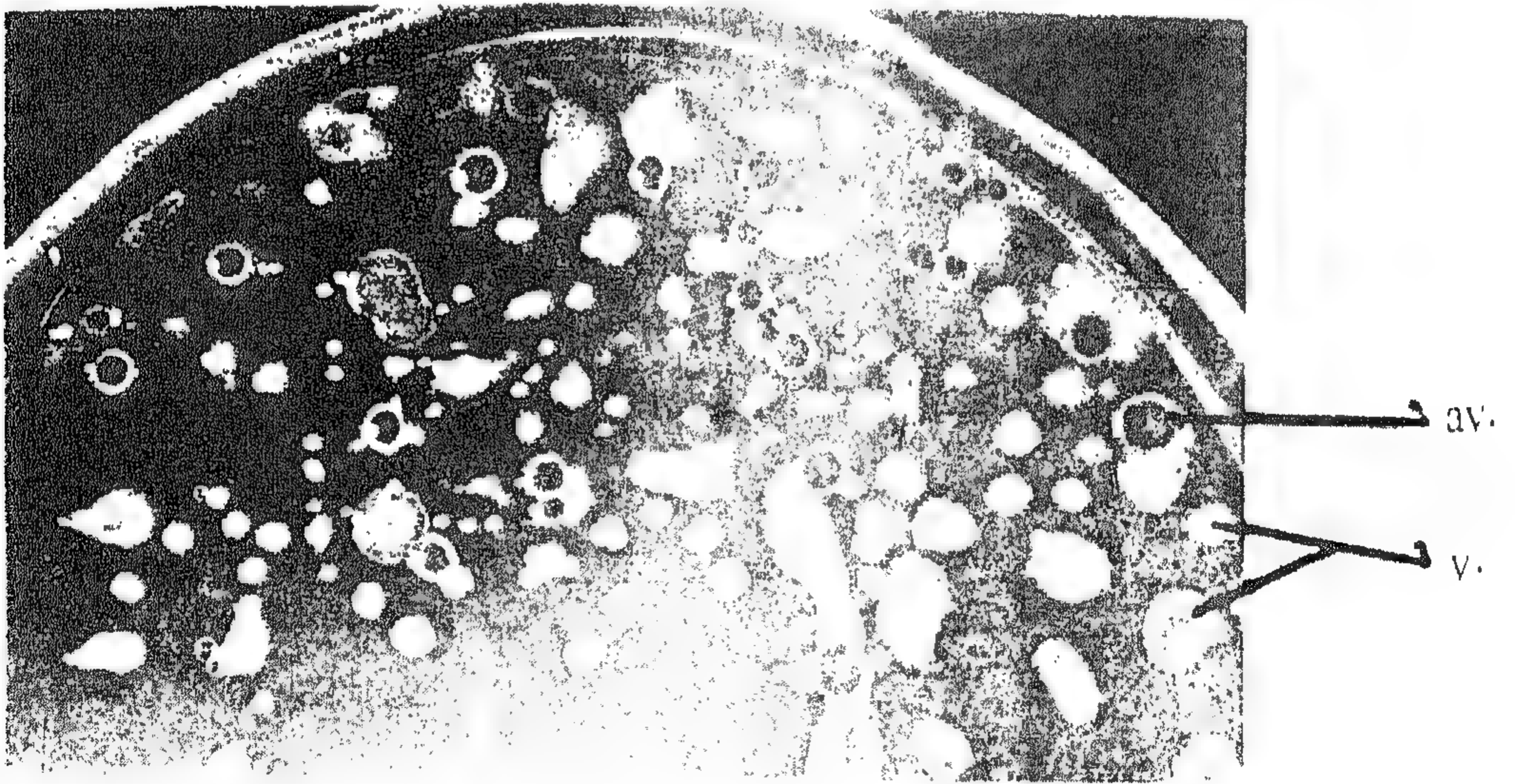
٤- إفحص المستعمرات النامية في الأطباق .

٥- صف المستعمرات الناتجة في كل حالة . لاحظ أن مستعمرات

المزرعة الحديثة والتي سبق تجديدها بيضاء وغير منتظمة وسائله Fluidal (شكل ٥٧) أما المستعمرات الناتجة عن مزارع قديمة سبق تجديدها عدة مرات

فأنه يظهر علاوة على النوع السابق من المستعمرات نوع آخر من المستعمرات الطفرية يتميز بأنه مستدير وزبدى القوام ولونه أحمر غامق مع وجود حافة ضيقة شفافة (شكل ٥٧) .

٦- إجرى عدوى صناعية على نباتات بطاطس وطماطم نامية فى تربة معقمة فى إصص معقمة . وتجرى العدوى الصناعية بوخز الساق بأبرة تشريح معقمة وعليها جزء من النمو البكتيرى . تلقح مجموعة من النباتات بلقاح من النوع الأول من المستعمرات (بيضاء) ومجموعة أخرى بلقاح من النوع الثانى من المستعمرات (حمراء) وتؤخذ مجموعة من النباتات بأبرة تشريح معقمة فقط وتترك للمقارنة. تترك النباتات فى الجو العادى على درجة ٢٦-٢٨° م .



شكل ٥٧ : مستعمرات من البكتير *Pseudomonas solanacearum* النامية على بيئة آجار الجليسرول المحتوية على مادة التترازوليم كلوريد. المستعمرات البيضاء أو البيضاء ذات مركز أحمر مستعمرات ممرضة Virulent . المستعمرات الحمراء غير ممرضة avirulent .

٧-نباتات الطماطم والبطاطس الملقحة بالمستعمرات البيضاء تذبل تماماً بعد خمسة وسبعة أيام على التوالي فى حين أن النباتات الملقحة بالمستعمرات الحمراء وكذلك نباتات المقارنة لم يحدث لها ذبول أو أى أعراض مرضية خلال نفس هذه المدة (شكل ٥٨) .



شكل ٥٨ :العدوى الصناعيه بواسطة البكتيرة *Pseudomonas solanacearum* لصنف البطاطس نيقولا. (A) نبات سليم غير معدى. (B) نبات معدى بمستعمرات بيضاء a highly virulent strain . (C) نبات معدى بمستعمرات بيضاء ذات مركز أحمر virulent strain . (D) نبات معدى بمستعمرات حمراء غير ممرضه avirulent .

تجارب فى البكتيريولوجيا التطبيقية

أولاً : بكتيريولوجيا الألبان

لما كان تركيب اللبن يلائم نمو الكثير من البكتيريات لذلك يجب الاهتمام بإنتاج اللبن ليصل إلى المستهلك وبه أقل كمية من الخلايا البكتيرية وخاصة الكائنات الممرضة وأول خطوات الفحص المعملى هو الحصول على عينات من اللبن ممثلة للبن المنتج .

أخذ العينة :

والعينات تكون أما من اللبن الخام الناتج بالمزرعة بمجرد إنتاجه أو بمجرد وصوله إلى المصنع أو أثناء تصنيعه أو من اللبن المعروض بالأسواق للأستهلاك. وفى كل الحالات يلزم تقليب اللبن جيداً بمقلبات خاصة والمقلب عبارة عن قرص مثقب من المعدن قطره حوالى ١٢-١٥ سم يتصل به يد من الصلب غير القابل للصدأ معقمة بطول متر واحد .

ويمكن فصل القرص عن اليد للتنظيف والتعقيم . ولكل من الأقراص والأيدى أوعية خاصة توضع بها لأجراء التعقيم .

التمرين الثانى والسبعون

- ١- يقلب اللبن جيداً- يراعى استعمال مقلب لكل قسط أو حوض .
- ٢- تؤخذ بواسطة ماصة معقمة عينة من اللبن .
- ٣- توضع العينة فى زجاجة معقمة ويراعى أن لا يملئ اللبن الزجاجية حتى يسهل رجها قبل الفحص .
- ٤- تفحص العينة فى بحر ساعة من أخذها .

٥- يمكن حفظ العينات في ثلاجة بدرجة ٤-٦° م لمدة ٦-١٢ ساعة إذا ما توفرت الثلاجات .

فحص العينات :

أ- العد القياسى بالأطباق.

التمرين الثالث والسبعون

- ١- نجهز عينة من اللبن الخام وأخرى من اللبن المبستر تجارياً .
 - ٢- يعمل فى كل تخفيفات فى حالة اللبن الخام إلى ١٠^{-٦} وفى حالة اللبن المبستر ١٠^{-٥} .
 - ٣- تتبع طريقة الأطباق المصبوبة مع استعمال بيئة آجار اللبن .
 - ٤- تحضن الأطباق على حرارة ٣٢-٣٥° م لمدة ٤٨ ساعة .
 - ٥- تعد المستعمرات .
- ب- طريقة العد المجهرى.

التمرين الرابع والسبعون

- ١- نجرى عمل غشاء فى اللبن على شريحة نظيفة .
- ٢- تغمر الشريحة فى الزيلول لمدة دقيقة للتخلص من الدهن .
- ٣- تغمر الشريحة فى كحول ٩٥٪ للتخلص من الزيلول .
- ٤- تغسل الشريحة بالماء الجارى للتخلص من الكحول .
- ٥- تغمر الشريحة بصبغة السفرانين لمدة ١ دقيقة .
- ٦- تغسل الشريحة بالماء الجارى .

٧- تترك الشريحة لتجف في الهواء الجوى .

٨- وضع نقطه من زيت السيدر وتفحص بالعدسة الزيتيه ثم يقدر عدد الخلايا في الملليتر الواحد في اللبن .

ج- اختبار أزرق المثيلين

يعتبر هذا الاختبار من أهم الاختبارات التي تجرى لتقدير نظافة اللبن في حالة

عدم توفر الأجهزة الخاصة بالاختبارات الأخرى . والأساس في هذا الاختبار أنه كلما زاد

ما تحتويه العينة من ميكروبات كلما قل الوقت اللازم للأختزال وزوال اللون الأزرق .

التمرين الخامس والسبعون

١- حضر أنبوبة اختبار معقمة وأضف إليها ١مل من محلول أزرق المثيلين (تركيز ١ : ١٠٠٠٠) .

٢- أضف بسرعة ١٠ مل من عينة اللبن .

٣- ضع الأنبوبة في حمام مائي درجة حرارته ٣٥°م ويترك لمدة خمس دقائق حتى تكتسب الأنبوبة حرارة الحمام .

٤- يراعى تقليب محتويات الأنبوبة عدة مرات حتى لا تطفو القشدة على السطح على أن تعاد للحمام بعد الرج .

- ٥- تفحص الأنابيب بعد نصف ساعة - مع تسجيل رقم الأنبوبة التي يتم بها اختزال أزرق الميثيلين بدرجة ٨٠٪ (أى اختفاء اللون الأزرق بنسبة ٨٠٪) وتترك مثل هذه الأنابيب جانبا وتحتسب لها وقت نصف ساعة .
- ٦- قلب الأنابيب المتبقية ثم ترجع إلى الحمام وتفحص بعد ساعة للتعرف على ما يحدث من اختزال .
- ٧- تكرر العملية بعد ساعة أخرى ويسجل ما اختزل منها بنسبة ٨٠٪ ثم تترك الأنابيب كما هي ساعة أخرى وهكذا إلى أن يمر ٢٤ ساعة ثم يلاحظ ما يحدث بها من تغييرات .

د- اختبار اختزال الرسازورين

من الاختبارات التي أضيفت حديثاً ويشابه الأساس فيها ذلك الخاص باختبار أزرق الميثيلين إلا أنها تتميز عليه بإمكانية تتبع اختزال الصبغة بدرجة أدق - فلون الرسازورين عند رقم الـ pH المتعادل يكون أزرق وعند اختزالها تتخذ اللون القرنفلى نتيجة لتكون مادة ريزوروفين - ويحدث اللون بالتدريج من البنفسجى ثم اللافندر ثم القرنفلى .

التمرين السادس والسبعون

- ١- يوضع فى أنبوبة معقمة ١مل من محلول الرسازورين .
- ٢- يضاف ١٠مل من عينة اللبن مباشرة وتسد الأنبوبة بغطاءها المعقم .
- ٣- تحضن على درجة ٣٥°م فى حمام مائى ثم تترك خمس دقائق وترج جيدا ثم تترك لمدة ساعة أخرى وتفحص الأنابيب - ثم يكرر الفحص

والتقليب كل ساعة - ويحسب الوقت الذى تتخذه الأنبوبة لنتخذ لون مونسيل القياسى Munsel colour standard.

تقدير محتويات القشدة فى الخمائر والفطريات :

تعتبر الخمائر من أهم عوامل تلف القشدة أو الزبد وخاصة فى أشهر الصيف أو عند حفظ القشدة فى الجو العادى لمدة طويلة . وهذه الكائنات تكون كحول وثانى أكسيد الكربون بكميات كبيرة مما يسبب حدوث رغوة بالقشدة . أما الفطريات فهى أهم ملوثات الذبد ويعتبر وجود الفطر *Geotricum candidum* دلالة على الأهمال المتناهى فى تصنيع الذبد .

التمرين السابع والسبعون

- ١- تعمل تخفيفات ١٠^{-١} ، ١٠^{-٢} ، ١٠^{-٣} من عينة القشدة .
- ٢- تفرد ١ مل من كل تخفيف على سطح بيئة آجار البطاطس والجلوكوز مع إضافة ١-٢ مل من محلول معقم ١٠٪ من حمض الترتاريك لكل ١٠٠ مل من البيئة حتى تميل الـ pH إلى الحموضة قليلاً .
- ٣- تحضن الأطباق على درجة ٢١°م لمدة خمس أيام وتعد مستعمرات الخمائر والفطريات التى تظهر .
- ٤- ينتخب بعض المستعمرات وتحضر منها شرائح وتفحص بعد صبغها بأزرق الميثيلين لمدة ١ دقيقة .
- ٥- ينقل لقاح من المستعمرة إلى أنبوبة لين عباد الشمس وتحضن على درجة ٢١°م لمدة يومين .

الفحص الميكروبي للزبد

التمرين الثامن والسبعون

- ١- ضع قطعة صغيرة من عينة الزبد على شريحة نظيفة وتصهر بالتدفئة بأحتراس شديد فوق اللهب .
- ٢- يوضع نقطة من الأسيتون على الشريحة وتمزج بالزبد المنصهر باستعمال أبرة معقمة ثم يتخلص مما على الشريحة .
- ٣- كرر ما تم عمله فى رقم ٢ ثم تترك الشريحة لتجف بالهواء .
- ٤- تصبغ الشريحة ثم يجرى العد الميكروبي كما تم بأستعمال عينات اللبن .

تقدير تعداد الخمائر والفطريات

التمرين التاسع والسبعون (أ)

- ١- توضع جزء من عينة الزبد فى ورق معقم ثم تصهر فى حمام مائى على درجة ٥٠°م لمدة ١٥ دقيقة .
- ٢- يعمل تخفيفات ١٠^{-١} ، ١٠^{-٢} وينقل ١ مل من كل تخفيف إلى طبق بترى ثم يصب عليها بيئة آجار البطاطس والجلوكوز .

عد البكتيريات فى الزبد :

التمرين التاسع والسبعون (ب)

- ١- توضع قطعة من الزبد ١ جم على شريحة نظيفة وتصهر بالتدفئة بأحتراس فوق لهب بنزن .

- ٢- توضع عدة نقط من الأسيتون وتمزج مع الزبد المنصهر جيداً ثم يتخلص مما على الشريحة بصبه في كأس .
- ٣- تكرر هذه العملية ثم تترك الشريحة لتجف في الهواء .
- ٤- تصبغ الشريحة بالفوكسين ويقدر تعداد الخلايا في اسم^٢ من الشريحة.

البادئات Starters

البادئات عبارة عن مزارع نقية من ميكروبات معينة تضاف أثناء تصنيع بعض منتجات الألبان بقصد أنضاجها وأكسابها صفات مميزة في الطعم واللون ودرجة الحموضة -وتباع هذه البادئات أجهزة في الأسواق في صورة مجففة تحت ضغط وتجميد lyophilized - كما يمكن الاحتفاظ بها في صورة حية بالمعامل . وللكشف عن مدى كفاءة ودرجة تلوث هذه البادئات يجري عليها باستمرار اختبارات للتأكد من صحتها .

التمرين الثمانون

- ١- جهز ٥٠٠ مل من لبن فرز مبستر في ورق مخروطي سعة لتر ذو سداده قطنية .
- ٢- يبرد اللبن إلى درجة ١٠٠ فهرنهايت .
- ٣- يلقح اللبن بواسطة ٥ مل من مزرعة *Lactobacillus acidophilus* أو *Lactobacillus bulgoricus* ويحضان على درجة ٣٧°م لمدة ١٦ ساعة - مثل هذه المزرعة تستعمل لتلقيح مزارع أخرى .

- ٤- يضاف امل من المزرعة إلى ٩مل لبن فرز ثم يضاف امل من محلول الرسازورين وتوضع الانبوبة فى حمام مائى ٣٧° م .
- ٥- يقيم البادئ بأنه ممتاز إذا أختزل لونه ، امل فى ٣٥ دقيقة .
- جيد إذا أختزل لونه ، امل فى ٣٥-٥٠ دقيقة .
- متوسط إذا أختزل لونه ، امل فى ٥٠-٦٠ دقيقة .
- ردئ إذا أختزل لونه ، امل فى أكثر من ساعة .

دراسة بكتيريات حمض اللاكتيك :

التمرين الحادى والثمانون

- ١- حضر غشاء من عينة لبن الزبادى قديم بأخذ جزء بالأبرة وخلطه جيداً بماء معقم على سطح شريحة وأفرده جيداً .
- ٢- أترك الغشاء ليحفظ فى الهواء ثم ثبته حرارياً .
- ٣- أغسل الغشاء بعد تبريده فى الزيلول للتخلص من الدهن .
- ٤- أغسل الشريحة بالكحول للتخلص من ما يعلق عليها من الزيلول .
- ٥- أغسل بالماء الجارى .
- ٦- أصبغ الشريحة بصبغة جرام ثم أفحصه بالعدسة الزيتية .
- لاحظ وجود نوعين من البكتيريات *Lactobacillus Lactis* ذات خلايا عصوية فى سلاسل ، *Streptococcus Lactis* ذات خلايا كروية فى سلاسل أيضاً .

ثانياً : بكتيريولوجيا الأغذية

البيض ومنتجاته

فحص محتويات البيض الكامل

التمرين الثانى والثمانون

- ١- يغسل البيض من الخارج بالماء والصابون ثم يغمر فى محلول كحولى ٧٠٪ لمدة ١٠ دقائق ثم يحرق بقايا الكحول من على البيضة باللهب .
- ٢- يعمل فتحة قطرها ٢/١ بوصة فى الطرف الضيق للبيضة بواسطة مشرط . ثم تقلب محتويات البيضة وهى داخل قشرتها وتفرغ محتوياتها فى وعاء معقم وذلك بتعريض الطرف العريض من البيضة إلى لهب حقيقى .
- ٣- يمزج محتويات العينة جيداً للتجانس .
- ٤- يؤخذ ١ جرام من العينة ويخلط بـ ٩٩ مل من محلول ملهى معقم ويخلط جيداً ثم يجرى التخفيفات ١ : ٢ ، ١ : ٤ باستعمال محلول ملح فسيولوجى .
- ٥- نتبع طريقة الصب فى الأطباق وتقدير عدد المستعمرات وتحسب النتيجة على أساس عدد الخلايا فى ١ مل من العينة الأصلية .

اللحوم ومنتجاتها

أخذ العينات

التمرين الثالث والثمانون

- ١- تؤخذ العينات السطحية بواسطة سكين عريض معقم يكشط به السطح فى مواقع متعددة وتجمع ليصير وزنها ١١ جم يلاحظ أن لا يزيد سمك الكشط عن ٢ سم .

٢- تؤخذ العينات الداخلية من كتل اللحم وذلك بفتح القطعة من أى مكان مناسب لذلك- يراعى تعقيم سطح قطعة اللحم قبل قطعها لأخذ العينة بحرق السطح أو معاملته بالمطهرات الكيماوية . ثم تؤخذ العينة ١١ جم من الأنسجة الداخلية .

٣- يضاف إلى العينة (١ جم) ٩٩ مل من الماء المعقم ويجرى مزجها فى خلاط كهربائى لمدة ٣ دقائق ثم تجرى التخفيفات اللازمة .

٤- يمكن أتباع نفس الطرق فى أخذ عينات من الأسماك واللحوم المحفوظة مثل السجق والسلامون والباسطرمة وما يشابهها .

العد الكلى للبكتيريات

التمرين الرابع والثمانون

١- تستخدم طريقة الأطباق المصبوبة مع أستعمال بيئة آجار العد الكلى

٢- تحضن الأطباق على درجة ٢١°م لمدة ٣ أيام .

عد الخميرة والفطر

التمرين الخامس والثمانون

١- يجرى هذا الأختبار على العينات السطحية فقط باستخدام طريقة

الأطباق المصبوبة وباستعمال بيئة آجار البطاطس والدكستروز .

٢- تحضن الأطباق على درجة ٢١°م لمدة ٣-٥ أيام .

الدواجن

التلوث البكتيرى للدواجن يمكن أعتباره بصفة عامة تلوث سطحى لذلك

يجرى تقدير التلوث لأسطح الأجزاء المختلفة .

التمرين السادس والثمانون

- ١- تعقم أسطوانات قصيرة مصنوعة من ورق الكرتون أو أسطوانات معدنية ذات فتحات معلومة المساحة (يفضل مساحة حوالى ١٢ سم^٢) وذلك بوضعها فى أطباق بترى ومعقم بالأوتوكلاف .
- ٢- تعقم مراود خشبية مغطى طرفها بالقطن موضوعة فى أنابيب اختبار بالأوتوكلاف أيضاً .
- ٣- تستعمل أحد الأسطوانات المعقمة وتضغط بشدة على سطح جلد صدر الدجاجة أو أى مكان آخر يراد أخباره .
- ٤- يجرى مسح المساحة المحصورة فى الأسطوانة بمروود معقم .
- ٥- تكسر قمة المروود المغطاة بالقطن الممسوح به سطح الدجاجة ويوضع فى كمية معلومة الحجم من الماء المعقم ويرج بها جيداً لضمان توزيع البكتيريات فى الماء .
- ٦- تجرى التخفيفات اللازمة وتتبع طريقة الصب بالأطباق لأجراء العد الكلى مع استعمال بيئة الآجار المغذى .
- ٧- تحضن الأطباق لمدة ٣ أيام على درجة ٣٢°م ويجرى تقدير تعداد البكتيريات لكل ١ سم^٢ من سطح الجلد .

الأغذية المعلبة

تقسم الأغذية المعلبة إلى ثلاثة أقسام :

- ١- أغذية ضعيفة الحموضة ذات pH ٣, ٥ أو أكثر - مثال البسلة .
- ٢- أغذية متوسطة الحموضة ذات pH ٣, ٥ - ٥, ٤ مثال السبانخ

والفاصوليا •

٣- أغذية حمضية ذات pH ٥, ٤ أو أقل مثال الطماطم والفواكه .

أختبارات التحضين :

تجرى على العلب السليمة التي لا يظهر عليها أى علامة من علامات الفساد وذلك لغرض التعرف على قابليتها للحفظ دون تلف أو مدى درجة تعقيمها .

تحضن علب الأغذية متوسطة وضعيفة الحموضة لمدة ٤-٣٠ يوم على درجة ٣٧°م ولمدة ٧-١٠ أيام على درجة ٥٥°م ولاداعى لتحضين علب الأسماك على الدرجة الأخيرة - أما الأغذية الحمضية فتحضن لمدة ١٤ يوم على درجة ٣٧°م ولا داعى لتحضينها على درجة ٥٥°م .

يجرى فحص العلب المحضنة على فترات منتظمة للكشف عن حدوث انتفاخ وتزال العلب المنتفخة وتحلل ميكروبيولوجياً كما يلى .

فتح العلب :

التمرين السابع والثمانون

١- تنظف العلب بالماء والصابون .

٢- تعقم أماكن فتح العلبة ويجرى هذا عادة من قاع العلبة وذلك بتعريضه إلى لهب خفيف - وفى حالة العلب المنتفخة تعقم بالكيمائيات بدلاً من اللهب - فى حالة الأغذية السائلة نعمل ثقب قطره حوالى ١/٢ بوصة بواسطة ثاقب - أما الأغذية الصلبة فيعمل فتحة بشكل قرص دائرى بواسطة فتاحة خاصة بذلك .

- ٤- يلقح أربعة أنابيب من بيئة مرق الجلوكوز والتربتون المضاف إليها دليل البروموكريزول بحوالي ٢ جم أو ١ مل من الغذاء المحفوظ بكل أنبوبة للكشف عن البكتيرات الهوائية .
- ٥- فى حالة الكشف عن البكتيرات غير الهوائية - يضاف إلى البيئة السابقة بعد تسخينها وتبريدها لأخراج الهواء الذائب منها - كمية من آجار التربتون ويترك ليتصلب على سطحها ثم تلقح بنفس الكميات .
- ٦- تحضن الأنابيب على درجة ٣٧°م لمدة ٢ - ٣ أيام .

التسمم الغذائى :

عند الاشتباه فى حدوث تسمم فى غذاء ما يجرى تحضير غشاء مثبت من نقطة ممثلة لهذا الغذاء على شريحة زجاجية ويصبغ بطريقة جرام ويفحص مجهرياً للتعرف على البكتيرة السائدة فى الغذاء وعلى الأخص التابعة لجنس *Clostridium* - وكذلك البكتيرات الكروية الموجبة لهذه الصبغة والعصوية السالبة لها .

١- فى حالة التسمم الناتج عن الـ *Clostridia*

التمرين الثامن والثمانون

- ١- ولأثبات وجود السم بالغذاء وخاصة الناتج من *Clostridia* تغذى مجموعة من الفئران (أرانب التجارب) على ٢-٥ مل لكل حيوان من الغذاء البارد وأخرى من الغذاء المسخن للغليان وتلاحظ الحيوانات لمدة تتراوح بين عدة ساعات إلى ٣-٤ أيام .

٢- فى حالة وجود السم تموت الحيوانات المغذاه على الغذاء غير المسخن خلال ساعات من تناولها للغذاء والتي تتغذى على الغذاء المسخن فأن الحيوانات قد تعيش لمدد طويلة - وموتها بعد ذلك يؤكد وجود سم مقاوم لفعل الحرارة .

٢- فى حالة التسمم الناتج عن *Staphylococci* التمرين التاسع والثمانون

- ١- تلقح أطباق محتوية على آجار الدم بواسطة التخطيط بتخفيف ١٠^{-١} من مزيج من الغذاء والماء وخلطه جيداً بخلاط كهربائى .
- ٢- تحضن الأطباق على درجة ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .
- ٣- وجود مستعمرات محالة للدم يثبت وجود سلالات من *Staphylococci* محدثة للتسمم الغذائى .

٣- فى حالة التسمم الناتج عن *Salmonella* التمرين التسعون

- ١- عند الاشتباه بتلوث الغذاء بكميات كبيرة من البكتيره العصوية القصيرة السالبة لجرام وغير المتجرثمة، تلقح الاطباق بطريقة التخطيط على بيئة آجار كبريتيت البزموت بعينة من الغذاء مباشرة أو من التخفيف المناسب منه حتى يمكن الحصول على مستعمرات مفردة .
- ٢- تحضن الأطباق على درجة ٣٧° م لمدة يومين ثم يفحص لوجود مستعمرات مثالية من البكتيره أو البكتيريات التابعة لجنس *Salmonella* .

ثالثاً: بكتيريولوجيا الأراضى

أخذ العينات للتحليل البكتيريولوجى :

التمرين الحادى والتسعون

- ١- نستعمل أنبوبة معدنية بطول ٣٠ سم ويراعى تعقيم الأنبوبة قبل أخذ العينة.
- ٢- وغالباً ما تكون العينات سطحية على بعد ١٠-١٥ سم من سطح التربة.
- ٣- توضع العينات مباشرة فى أكياس بلاستيك أو أوانى خاصة نظيفة.
- ٤- يؤخذ ٥ عينات بطريقة عشوائية لنوع واحد من الأراضى.
- ٥- تجفف العينات فى الهواء .
- ٦- تمرر خلال منخل سعة ثقوبه ٥ مم لأزالة الحصى والأحجار وجذور النباتات ثم تمرر خلال منخل سعة ثقوبه ١ مم ثم توضع فى أوعية محكمة القفل .
- ٧- تحفظ العينات على درجة حرارة منخفضة أثناء التخزين وتحلل فى أقرب وقت ممكن أقل من أسبوعين .
- ٨- تخلط العينات الخمس للأرض الواحدة جيداً ثم تقسم إلى قسمين أو ثلاث ويؤخذ منها ١٠ مم لتحضير معلق الأرض .
- ٩- يرج المعلق لمدة ١٥ دقيقة بواسطة جهاز رج لضمان تفريق الأحياء الدقيقة عن حبيبات التربة .
- ١٠- يلزم قبل إجراء معلق الأرض أن تقدر فى البيئة نسبة الرطوبة حتى يمكن حساب النتائج على أساس الوزن الجاف للبيئة .

تقدير تعداد البكتيريات فى التربة :

أ- العد المباشر

التمرين الثانى والتسعون

١- توضع اجم من عينة الأرض فى أنبوبة اختبار محتوية على ٩ مم من محلول آجار مائى ١٪ أو محلول جيلاتين ٠.١٥ ٪ وترج جيداً وتترك لتترسب حبيبات الأرض الكبيرة .

٢- ينقل ٠.١ مل من المعلق إلى شريحة زجاجية ويفرد بانتظام فى مساحة اسم^٢ وتترك الشريحة لتجف بالهواء .

٣- تغمر الشريحة فى محلول حمض الخليك ٤٠ ٪ لمدة ١-٣ دقائق ثم تغسل بالماء .

٤- توضع الشريحة على حمام مائى (كأس به ماء يغلى) ثم تصبغ بصبغة الاريتروسين لمدة ٥-٦ دقائق - مع تجنب جفاف الصبغة (يضاف المزيد منها كلما قلت كميتها على الشريحة) - تظهر الخلايا البكتيرية بلون أحمر قائم تحت المجهر .

٥- يقدر عدد الخلايا فى كل من ٢٥ حقل ميكروسكوبى والمتعرف على مساحته من قبل ويأخذ المتوسط .

ب - العد بطريقة الأطباق

أولاً : البكتيريات الهوائية

التمرين الثالث والتسعون

١- يجرى عمل تخفيفات من معلق التربة ١٠^{-٣} إلى ١٠^{-٧}

٢- يستعمل ٣ أطباق من بيئة مستخلص الأرض وخلاصة الخميرة لكل تخفيف .

٣- تحفظ الأطباق على درجة ٢٥° م لمدة ٥-٧ أيام ثم تعد المستعمرات.

٤- يستبعد الأطباق المحتوية على أقل من ٣٠ مستعمرة والتي تزيد عن ٣٠٠ مستعمرة وكذلك الأطباق التي تظهر تضاد بين نمواتها أو المحتوية على فطريات أو المحتوية على مستعمرات غير موزعة بانتظام .

٥- توصف المستعمرات ويحضر غشاء من كل نوع منها ويصبغ بطريقة جرام .

ثانياً : البكتيريات الهوائية المتجترمة

التمرين الرابع والتسعون

١- تجرى الخطوات السابقة ولكن بعد بسترة التخفيفات المستعملة وذلك بوضع ١٠ مل من كل تخفيف في أنبوبة معقمة ثم تسخن في حمام مائي درجته ٨٠° م لمدة ١٠ دقائق - ثم يؤخذ منها الكمية اللازمة ليلقح الطبق .

٢- المستعمرات الناتجة تكون للبكتيريات الهوائية المتجترمة حيث تعمل البسترة على قتل الخلايا الخضرية والبكتيريات غير المتجترمة .

ثالثاً : البكتيريات اللاهوائية

التمرين الخامس والتسعون

١- تتبع كل خطوات عد مستعمرات البكتيريات الهوائية .

- ٢- تحفظ الأطباق تحت ظروف غير هوائية (خالية من الأكسجين)
راجع طرق تنمية البكتيريات غير الهوائية .

عزل البكتيريات من العقد الجذرية :

التمرين السادس والتسعون

- ١- تغسل جذور النبات البقولى، ويراعى أن يكون صغير العمر، بالماء وتنزع منه العقد الجذرية كبيرة الحجم مع أجزاء من الشعيرات الجذرية .
- ٢- توضع العقد فى أنبوبة محتوية على هيبوكلوريت الصوديوم ٥ % لمدة ٥ دقائق.
- ٣- تنقل العقد الجذرية بواسطة ملقط معقم إلى أنبوبة بها كحول ٧٥ % وتترك لمدة خمس دقائق .
- ٤- تغسل العقد بالماء المعقم عدة مرات .
- ٥- تنقل العقد إلى طبق بترى معقم به ٣ مل ماء معقم وتهرس بمشرط معقم.
- ٦- تنقل نقطة من المعلق بواسطة أبرة ذات العقدة معقمة إلى طبق بترى معقم يحتوى ١ مل ماء معقم ويخلط بها .
- ٧- ينقل نقطة بواسطة أبرة معقمة إلى طبق بترى آخر يحتوى على ١ مل ماء معقم ويخلط بها وتكرر العملية فى طبق ثالث - يمكن عمل غشاء للفحص المجهرى من هذا التخفيف .
- ٨- يصب ١٠ مل من بيئة آجار المانيتول و خلاصة الخميرة فى كل من الأطباق الثلاث الأخيرة وترج جيداً لتوزيع اللقاح .
- ٩- تحضن الأطباق مقلوبة على درجة ٢٨°م حتى تظهر نموات مستعمرات بكتيرية .

١٠- تحضر أغشية من المستعمرات الناتجة. وتجرى تحضير مزارع في أنابيب آجار المانيتول والخميرة .

أختزال النترات

قد تختزل الأزوتات الموجودة بالأرض تحت ظروف غير هوائية بواسطة أنواع كثيرة من البكتيريا - بعضها يختزل الأزوتات إلى آزوتيت والبعض الآخر يختزل الأزوتيت إلى نشادر ولأختبار أختزال الأزوتات يتبع مايلي :

التمرين السابع والتسعون

١- تلقح أنابيب درهام محتوية على بيئة آزوتات الجلوكوز بمقدار امل من معلق الأرض أو معلق سماد عضوى أو ماء الترعة أو البحيرة - مع ترك أنبوبة بدون تلقيح .

٢- تحفظ الأنابيب على درجة حرارة ٣٠°م لمدة أسبوع .

٣- تختبر محتويات كل أنبوبة لوجود الأزوتات والأزوتيت والنشادر وغاز الأزوت.

٤- يحضر غشاء من كل أنبوبة ويصبغ بطريقة جرام .

ولأختبار المواد السابق الإشارة إليها :

أولاً : أختبار النشادر

التمرين الثامن والتسعون

يوضع نقطتان من المزرعة في تجويف طبق خزفي أبيض يضاف إلى كل منهما نقطة من كاشف نسلر. يتكون راسب أصفر يدل على وجود النشادر.

ثانياً : اختبار وجود الآزوتيت

التمرين التاسع والتسعون

- ١- يوضع ثلاث نقط من كاشف ترومسدورف فى تجويف طبق خزفى أبيض.
- ٢- يضاف إلى التجويف نقطة من حامض كبريتيك مخفف ٣:١ .
- ٣- يضاف نقطة من المزرعة .
- ٤- تكون لون أزرق يدل على وجود الآزوتيت .

ثالثاً : اختبار وجود النترات

التمرين المائة

- ١- تغلى كمية من المزرعة مع كمية مماثلة من الكحول وكبريتات النشادر بتركيز ٢٥٪ مع إضافة ١٠ نقط من حمض الخليك وذلك للتخلص من الآزوتيت .
- ٢- توضع نقطة من المخلوط السابق فى تجويف طبق خزفى أبيض .
- ٣- يضاف للتجويف نقطة من كاشف داي أمين ثم نقطة من حمض كبريتيك مركز .
- ٤- تكون لون أزرق يدل على وجود النترات .

التقدير الحيوى لمحتويات الأرض من البوتاسيوم :

التمرين الحادى بعد المائه

- ١- جهاز أربعة دوارق مخروطية سعة ٢٥ مل ومحتوية على ٣٠ مل بيئة مهلش معقمة.
- ٢- أضف لكل دورق ٥, ٢ جم من عينة التربة .
- ٣- أضف لكل دورق ٥, مل من معلق جراثيم *Aspergillus niger* .
- ٤- تحضن الدوارق على درجة ٣٥°م لمدة ٤-٥ أيام .
- ٥- ينقل النمو الفطرى المتكون بشكل طبقة فوق البيئة من كل دورق إلى كأس زجاجى ويغسل جيداً بالماء لإزالة حبيبات التربة العالقة به .
- ٦- تجمع نموات الأربعة دوارق وتجفف على أوراق ترشيح ثم توضع فى علبه من الألمنيوم معروفة الوزن وتجفف ٤ ساعات فى فرن الهواء الساخن على درجة ٧٠-٩٠°م لمدة ٤ ساعات ثم على درجة ١٠٥°م لمدة ساعتين .
- ٧- يقدر الوزن الجاف للمجموع الميسليومى فى الاربع علب ويخصم وزن العلب فإذا كان الوزن أقل من ٤, ١ جم تحتاج الأرض إلى بوتاسيوم وإذا كان الوزن من ٤, ١ إلى ٢ جم تحتاج الأرض إلى البوتاسيوم بقله . أما إذا كان الوزن أكثر من ٢ جم فلا تحتاج الأرض لبوتاسيوم .

رابعاً: بكتريولوجيا المياه

عادة يختبر المياه للتعرف على مدى صلاحيتها للاستعمال الأدمى وخاصة للتأكد من عدم وجود بكتيريات ممرضة وضارة بالصحة مثل بكتيريات القولون التى يدل وجودها على تلوث المياه بمياه الصرف الصحى . ولإجراء ذلك يراعى ما يلى :

تؤخذ عينات من المياه فى زجاجات نظيفة ومغسولة جيداً ومعقمة فى فرن الهواء الساخن - يراعى فى أخذ العينة الشروط البكتريولوجية للتعامل مع العينات مع عدم ملئ الزجاجاة إلى آخرها ليسهل الرج قبل الفحص .
إذا أريد اختبار مياه الصنبور يشترط فتحه لمدة ٥ دقائق قبل أخذ العينة - وعند أخذ عينة من مياه حمامات السباحة أو مياه الشرب المعاملة بالكلور يجب معاملةها بأحدى المواد المضادة للكلور مثل الثيوكبريتات حتى يصبح تركيزها فى الماء ١٠٠ ملليجرام/لتر ماء .

العد الكلى :

التمرين الثانى بعد المائة

- ١- تحضر التخفيفات الآتية من العينة ١٠^{-١} ، ١٠^{-٢} .
- ٢- يوضع امل من كل تخفيف فى طبق بترى معقم .
- ٣- يصب على كل طبق بيئة آجار مغذى ويخلط جيداً بالعينة المخففة وتترك لتتصلب .
- ٤- تحضن على درجة ٢٧°م لمدة ٤٨ ساعة ثم تعد المستعمرات الناتجة .

الأختبار التخمينى لبكتيرة القولون Presumptive test

التمرين الثالث بعد المائه

- ١- يضاف ١ مل من العينة بدون تخفيف وكذلك ١ مل من تخفيف ١٠-١ إلى كل من أنابيب دورهام المحتوية على ٥ مل من مرق تخمر اللاكتوز .
- ٢- تحضن الأنابيب على درجة ٣٧°م وتفحص بعد ٢٤-٤٨ ساعة للتعرف على تكوين حامض وغاز .
- ٣- تكون حامض وغاز يشغل ١٠٪ من الأنبوبة الصغيرة الداخلية خلال ٢٤ ساعة يدل على أن الأختبار موجب .
- عدم تكون غاز خلال ٤٨ ساعة يدل على أن الأختبار سالب وغياب بكتيرة القولون.

الأختبار التأكيدى Comfirmative test

التمرين الرابع بعد المائه

- ١- تؤخذ أحد الأنابيب التى ظهر بها غاز فى الأختبار السابق .
- ٢- يلقح بها طبق بترى محتوى على بيئة أندروآجار وطبق آخر به آجار أيوسين أزرق الميثيلين على أن يكون التلقيح بالتخطيط .
- ٣- تحفظ الأطباق على درجة ٣٧°م ثم تفحص بعد ٢٤-٤٨ ساعة للتعرف على مستعمرات ذات بريق معدنى على بيئة الأيوسين أزرق الميثيلين وذات لون أحمر ذو لمسه خضراء على بيئة أندروآجار وهى مستعمرات *E. coli* .

الأختبار التكميلي Complementary test

التمرين الخامس بعد المائه

- ١- ينقل جزء من المستعمرة التي لها صفات *E. coli* إلى أنبوبة دورهام المحتوية على مرق تخمر اللاكتوز .
- ٢- تكون غاز وحمض بعد ٤٨ ساعة على ٣٧°م يؤكد وجود بكتيرة القولون .
- ٣- تعزل البكتيرة في صورة نقية ويجرى عليها الأختبارات الأخرى .

خامساً : البكتيرولوجيا النباتية

Phytobacterology

(البكتيريات الممرضة للنبات)

تصاب النباتات بالعديد من البكتيريات التي تسبب لها أعراضاً خطيرة تؤدي إلى موت النبات أو الأقلال من إنتاجه بدرجة ملحوظة وعادة ما تتخذ الأصابات البكتيرية للمحاصيل النباتية المظهر الوبائي وذلك لسرعة انتشارها بالعوامل الجوية كالأمطار المصحوبة بالرياح والحشرات وغيرها من وسائل نقل الأمراض .

وفيما يلي بعض التمارين لدراسة بعض هذه الأمراض .

التمرين السادس بعد المائة

١- حضر مزارع حديثة من البكتيريات الآتية :

Erwinia carotovora , *Agrobacterium tumefaciens* , *Escherichia coli*

٢- أغسل أحد جذور الجزر جيداً ثم عقمه سطحياً وذلك بغمره في محلول هيبوكلوريت الصوديوم ٥ ٪ لمدة ٥ دقائق ثم أغسله بالماء المعقم عدة مرات، يفضل إعادة التعقيم بالتطهير بغمره في كحول وتعريضه للهب حتى ينطفئ ما يشب به من لهب .

٣- قطع الجزر بشكل شرائح ذات سمك لا يقل عن اسم بواسطة سكين معقم . وضع الشرائح بمقاطع معقم في أربعة أطباق بترى معقمة يحتوى كل منها على ٣-٥ مل ماء معقم .

٤- لقح سطح شريحة الجزر بكل من *E. carotovora* وفي الثانى بواسطة *Agrobacterium tumefaciens* وفي الثالث بواسطة *E. coli* والرابع يترك بدون تلقيح للمقارنة .

- ٥- تحضن في حضان على درجة ٢٥°م لمدة أسبوعين .
- ٦- أفحص الأطباق دورياً كل ٤٨ ساعة في حالة الطبق الأول يتكون عفن جزئى لشريحة الجزر خلال ٤٨ ساعة وفي الثانية تتكون أنسجة تورمية على سطح الشريحة بعد فترة تتراوح بين ١٠-١٤ يوم وفي الثالث والرابع لا يحدث للشرائح أى شئ .

عزل بكتيرة العفن الطرى *Erwinia carotovora var carotovora*

التمرين السابع بعد المائه

- ١- حضر درنة بطاطس مصابة بالعفن الطرى في مراحله الأولى - ثم عقمها من الخارج بمحلول من هيبوكلوريت الصوديوم ٥% لمدة ٥ دقائق ثم أغسلها بالماء المعقم لازالة بقايا المطهر واتركها لتجف .
- ٢- أقطع الدرنة إلى نصفين بواسطة مشرط أو سكين معقم بالتطهير .
- ٣- بواسطة ابرة تلقيح معقمة خذ جزء من أنسجة الدرنة في حدود الأنسجة المتهتكة وليس منها - وتنقل إلى طبق بترى معقم يحتوى على امل ماء معقم وتهرس جيداً .
- ٤- تؤخذ نقطة من المعلق إلى طبق بترى آخر محتوى على امل ماء معقم وتخلط به جيداً .
- ٥- تكرر العملية في طبق ثالث بنفس الشروط .
- ٦- تجهز بيئة آجار مغذى سائلة على درجة ٤٠°م ويصب منها ١٠ امل تقريباً بكل طبق من الأطباق الثلاث - تحرك الأطباق حركة رحويه لتوزيع اللقاح في البيئة .

- ٧- توضع الأطباق بالحضان على درجة ٢٥°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ثم تفحص وتعزل البكتيريات من المستعمرات المفردة والمميزة .
- ٨- لاختبار كفاءة العزل يعدى شرائح جزر فى أطباق بترى معقمة ومحتوية على قليل من الماء وتترك ٤٨ ساعة كما فى التمرين السابق - حدوث عفن طرى بالشرائح يؤكد كفاءة العزل .

عزل بكتيرة اللفحة النارية للكمثرى *Erwinia amylovora var amylovora* التمرين الثامن بعد المائه

- ١- يجهز مجموعة من الأزهار المصابة بلفحة الأزهار وتغسل واحدة جيداً عدة مرات بتمريرها فى سلسلة من الماء المعقم (٥-٦ مرات) ثم توضع الزهرة فى طبق بترى معقم ومحتوى على ٢مل ماء معقم .
- ٢- تسحق الزهرة فى الماء بواسطة مشرط معقم .
- ٣- ينقل نقطة بواسطة أبرة تلقيح معقمة إلى طبق بترى آخر محتوى على ١مل ماء معقم .
- ٤- تكرر العملية ٣ مرات وذلك بنقل نقطة من كل طبق إلى الآخر .
- ٥- تصب كمية مناسبة من الآجار المغذى + ٥٪ سكروز فى الأطباق الثلاث الأخيرة وتحرك الأطباق رحولاً لتوزيع اللقاح .
- ٦- تحضن الأطباق على درجة ٢٥°م لمدة ٢-٤ يوم يفحص خلاله يومياً .

- ٧- يعزل البكتيرة فى المستعمرات المميزة لها .
- ٨- لإختبار كفاءة العزل - تعدى ثمار كمثرى خضراء صغيرة غير تامة النضج عن طريق الوخز بأبره تحمل لقاح من المستعمرات المميزة -

تحضن الثمار المعداه وهى فى جو رطب على درجة حرارة المعمل لمدة ٧-١٠ أيام، ظهور نموات بكتيرية (ooze) غزيرة علاوة على اسوداد أماكن الوخز يدل على كفاءة العزل .

عزل بكتيرة التدرن التاجى *Agrobacterium tumefaciens*

التمرين التاسع بعد المائة

١- يغسل الجزء المتدرن من العينة جيداً بالماء ثم يعقم سطحياً بمسحه عدة مرات بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم ٥% ثم يغسل عدة مرات بالماء المعقم .

٢- يقطع الجزء المتدرن إلى نصفين بواسطة مشرط معقم .

٣- يعقم المشرط ثم يؤخذ به قطعة صغيرة من الطبقة الخارجية من النسيج أسفل القشرة مباشرة .

٤- توضع هذه القطعة فى طبق بترى محتوى على ١مل ماء معقم ثم تهرس القطعة فى الماء ليتكون معلق .

٥- يؤخذ نقطة من المعلق الناتج وتخلط بكمية ١مل ماء معقم فى طبق بترى آخر معقم .

٦- يؤخذ نقطة من الطبق الثانى ويخلط بكمية ١مل ماء معقم فى طبق ثالث وتكرر العملية فى طبق رابع .

٧- يصب كمية من الآجار المغذى بكل طبق من الأطباق الثلاث الأخيرة .

٨- تحضن الأطباق على درجة ٢٥°م لمدة أسبوع يفحص خلالها يوميا.

٩- تعزل البكتيرة فى مزرعة نقية من مستعمرات مفردة مميزة للبكتيرة .

١٠- لاختبار كفاءة العزل يلحق عدة شرائح جزر موضوعة فى أطباق بترى معقمة محتوية على قليل من الماء . وتترك بالحضان ٢٥°م لمدة أسبوعين يفحص خلالها لتكون نموات تكلسية غير منتظمة على سطح الشرائح وهذا يؤكد كفاءة العزل .

عزل بكتيرة العفن البنى فى البطاطس *Pseudomonas solanacearum* التمرين العاشر بعد المائة

١- تجهز درنة مصابة بالعفن البنى وتغسل جيداً بالماء ثم يعقم سطحها بمسحه بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم ٥% عدة مرات ثم غسلها بالماء المعقم عدة مرات أيضاً .

٢- تشق الدرنة إلى نصفين وتترك الشقين تحت ناقوس زجاجى نظيف لمدة ٢٤-٤٨ ساعة مع توفير الرطوبة .

٣- يضغط على أحد نصفى الدرنة فتظهر نموات بكتيرية (ooze) غزيرة من النسيج الوعائى .

٤- بواسطة أبرة معقمة يؤخذ جزء من هذه النموات البكتيرية وتخفف فى ١ مل معقم بطبق بترى .

٥- يستعمل المخلوط الناتج فى تخطيط بيئة آجار جلسرول + ٠,٠٠٢% تراهى فينايل تترازوليم كلوريد بأطباق بترى .

٦- تعزل البكتيرة فى مزرعة نقية من أحد المستعمرات المميزة .

راجع التمرين الحادى و السبعون والخاص بعزل طفرات مختلفه فى قدراتها المرضيه .

ملحق ١

البيئات الغذائية

بيئة آجار ايوسين أزرق الميثيلين

جرام	١٠	بيتون
جرام	١٠	لاكتوز
جرام	٢	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
جرام	٢٠	آجار
جرام	,٤	ايوسين
جرام	,٠٦٥	أزرق الميثيلين
لتر	١	ماء مقطر

الـ pH النهائي ١, ٧

بيئة آجار تشابك دوكنس

تستعمل عادة لزراعة الفطريات

جرام	٣٠	سكرور
جرام	٣	نترات صوديوم
جرام	١	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
جرام	,٥	كبريتات مغنسيوم
جرام	,٥	كلوريد بوتاسيوم
جرام	,٠١	كبريتات حديدوز
جرام	٢٠-١٥	آجار
لتر	١	ماء مقطر

بيئة آجار جلوكوز

جرام	٣	مستخلص لحم
------	---	------------

جرام	٥	ببتون
جرام	١٠	جلوكوز
جرام	٢٠	آجار
لتر	١	ماء مقطر

بيئة آجار دكستروز البطاطس

تستعمل عادة لزراعة الفطريات

مستخلص مائي لـ ٢٠٠ جرام من البطاطس بعد غليه

لمدة ١٥ دقيقة وترشيحه

جرام	٢٠	دكستروز
جرام	٢٠	آجار
لتر	١	ماء مقطر

بيئة آجار مغذي

مستخلص لحم

جرام	٣	ببتون
جرام	٥	آجار
جرام	٢٠	ماء مقطر
لتر	١	

بيئة آجار اختبار الحركة Motility test agar

جرام	١٠	تربتوز
جرام	٥	كلوريد صوديوم
جرام	٥	آجار
لتر	١	ماء مقطر

بيئة آجار الثيوجليكولات

جرام	٥	ثيوجليكولات الصوديوم
------	---	----------------------

آجار	٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة آجار خلاصة الخميره

فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٢	جرام
خلاصة لحم	٣	جرام
خلاصة خميره	٢	جرام
تربتون	٥	جرام
جلوكوز	١٠	جرام
آجار	١٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة آجار الدم

مستخلص لحم	٣	جرام
تربتوز	١٠	جرام
كلوريد صوديوم	٥	جرام
آجار	١٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

قبل صب البيئة فى الاطباق يضاف ٥% دم مزال معقم.

بيئة آجار مانيتول خلاصة الخميره

فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٥	جرام
• $Mg.SO_4 - 7H_2O$	٢	جرام
• Na cl	١	جرام
• $CaCO_3$	٣	جرام
مانيتول	١٠	جرام

جرام	١٠	خلاصة خميره
جرام	١٥	آجار
لتر	١	ماء مقطر

يستغنى عن CaCO_3 فى حالة الصب فى الاطباق

جيل البكتات

جرام	١	فوسفات احادى الامونيوم
جرام	٠,٢	(Kcl)
جرام	٠,٢	(Mg SO_4)
لتر	١	ماء مقطر

يضاف ٢٠ جرام بكتات الصوديوم ثم يسخن إلى قرب الغليان ويقلب لمدة ٥ دقائق على هذه الدرجة من الحرارة ثم يضاف إلى المخلوط ٨ مل من محلول CaCl_2 وذلك لتكوين بكتات كالسيوم - ثم يعبئ فى الاطباق ويعقم

بيئة أحمر الكنغو

جرام	١٠	مانيتول
جرام	٠,٥	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
جرام	٠,٢	كبريتات مغنسيوم
جرام	٣	كربونات كالسيوم
جرام	٠,١	كلوريد صوديوم
جرام	١	مستخلص خميرة
مل	١٠	أحمر كنغو (١ : ٤٠٠ محلول مائى)
جرام	٢٠	آجار
لتر	١	ماء مقطر

بيئة أومليانسكى

جرام	١	كبريتات أمونيوم
جرام	١	فوسفات بوتاسيوم ثنائية
جرام	٠,٥	كبريتات مغنسيوم
جرام	٢	كربونات كالسيوم
جرام	٠,١	كلوريد صوديوم
لتر	١	ماء مقطر

بيئة السترات

جرام	١,٥	فوسفات صوديوم وأمونيوم
جرام	١	فوسفات أحادية البوتاسيوم
جرام	٠,٢	كبريتات مغنسيوم
جرام	٣	سترات صوديوم
لتر	١	ماء مقطر

بيئة جيلاتين مغذى

جرام	٣	مستخلص لحم
جرام	٥	بيتون
جرام	١٥٠	جيلاتين
لتر	١	ماء مقطر

(تعقم البيئة تعقيم متقطع)

بيئة ديبوز

جرام	٠,٥	نترات صوديوم
جرام	١	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
جرام	٠,٥	كبريتات مغنسيوم

٥ و ٠	جرام	كلوريد بوتاسيوم
٠٠١ و ٠	جرام	كبريتات حديدك
١	لتر	ماء مقطر

بيئة فوجس بروسكاور - أحمر الميثيل

٧	جرام	ببتون
٥	جرام	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
٥	جرام	جلوكوز
١	لتر	ماء مقطر

بيئة كايجلر

٣	جرام	مستخلص لحم
٣	جرام	مستخلص خميرة
١٥	جرام	ببتون
٥	جرام	بروتياز ببتون
١٠	جرام	لاكتوز
١	جرام	جلوكوز
٢ و ٠	جرام	كبريتات حديدوز
٥	جرام	كلوريد صوديوم
٣ و ٠	جرام	ثيوكبريتات صوديوم
١٥	جرام	آجار
٠٢٤ و ٠	جرام	أحمر فينول
١	لتر	ماء مقطر

بيئة لبن البروموكريزول الأرجواني

١٠٠	مل	لبن فرز طازج
-----	----	--------------

٠١٦ و ٠ جرام

بروموكريزول الأرجوني

(تعقيم البيئة تعقيم منقطع)

بيئة لبن عباد الشمس

يحضر بأضافة كمية كافية من محلول مائي مشبع من

عباد الشمس إلى لبن فرز طازج حتى يصبح اللون

أزرق واضح (تعقم البيئة تعقيم منقطع)

بيئة مرق التريبتون

تريبتون

١٠ جرام

مستخلص لحم

٣ جرام

ماء مقطر

١ جرام

بيئة مرق النترات

مستخلص لحم

٣ جرام

بيتون

٥ جرام

نترات بوتاسيوم

١ جرام

ماء مقطر

١ جرام

بيئة مرق أختزال الكبريتات

كبريتات الامونيوم

٢ جرام

كبريتات الحديدوز

٠٠١ جرام

فوسفات ثنائي البوتاسيوم

٥٠٠ جرام

لكتات صوديوم

٥ جرام

ماء مقطر

١ لتر

بيئة مرق الازوتات

بيتون خالي من النترات

١ جرام

٥, جرام	كلوريد صوديوم
٥, جرام	نترات بوتاسيوم
١ لتر	ماء مقطر
	بيئة مرق اللاكتوز
٣ جرام	مستخلص لحم
٥ جرام	بيبون
٥ جرام	لاكتوز
٠.١٦ و ٠ جرام	بروموثيمول الأزرق
١ لتر	ماء مقطر
	(تعقم البيئة تعقيم منتظم)
	بيئة مرق اليوريا
١ جرام	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
١ و ٠ جرام	كلوريد كالسيوم
٣ و ٠ جرام	كبريتات مغنسيوم
١ و ٠ جرام	كلوريد صوديوم
٠.١ و ٠ جرام	كلوريد حديدك
٥ جرام	مستخلص لحم
٢٠ جرام	يوريا
١ لتر	ماء مقطر
	تذاب اليوريا في ٥٠ مل ماء وتعقم على حدة بالترشيح
	ثم تضاف إلى باقى مكونات البيئة بعد تعقيمها .
	سليولوز الببتون
٢ جرام	فوسفات ثنائى الامونيوم

جرام	١	فوسفات احادى البوتاسيوم
جرام	٣	($Mg\ So_4 - 7. H_2 O$)
جرام	٤	($CaCl_2$)
جرام	٠.١	($FecI_3 - 6H_2 O$)
جرام	٣	($CaCo_3$)
جرام	٥	ببتون

يُضبط pH إلى ٤ , ٧

يُعبئ في انابيب كبيره ويضاف لكل انبويه ٣ جرام
قصاصات ورق ترشيح - كما يضاف $CaCo_3$ بعد التعقيم
بيئة مرق ببتون أملاح الصفراء واللاكتوز ودليل

الاخضر الزاهى

جرام	٣٠	صفراء ثور (Bacto)
جرام	٥	لاكتوز
جرام	٢٠	ببتون
جرام	٥	NaCL
جرام	٢	أخضر زاهى ١ %
لتر	١	ماء مقطر

بيئة مرق خلاصة المولت

جرام	٢٠	مستخلص المولت
لتر	١	ماء مقطر

بيئة مرق دكستروز تريبتون بروموكريزول

الارجوانى

جرام	١٠	تريبتون
------	----	---------

٥ جرام	دكستروز
٠.٤ و ٠ جرام	برومو كريزول أرجوانى
١ لتر	ماء مقطر
	بيئة مرق مغذى
٥ جرام	بيبتون
٣ جرام	مستخلص لحم
١ جرام	ماء مقطر
	بيئة مرق الفاج ذو التركيز عشرة أمثال المرق
	المغذى العادى
١٠٠ جرام	بيبتون
٥٠ جرام	مستخلص خميره
٢٥ جرام	ص كل
٨٠ جرام	فوسفات ثنائى البوتاسيوم
١ لتر	ماء مقطر
	يضبظ الـ pH النهائى ٦ , ٧

ملحق ٢

الصبغات والمحاليل التي تستعمل فى طرق الصبغ المختلفة

		ارثروسين
جرام	١	أرثروسين
مل	١٠٠	محلول فينول ٥%
جرام	٠,٥	كلوريد كالسيوم
		أزرق الميثيلين
جرام	٣,	أزرق الميثيلين
مل	٣٠	كحول ٩٥%
مل	١٠٠	ماء مقطر

أذب أزرق الميثيلين فى الكحول ثم أضف الماء المقطر
ورشح المحلول خلال ورق ترشيح .

صبغة الأسواط

محلول أ

جرام	٤	حمض تانيك
جرام	١,٥	كلوريد حديدك
مل	١٠٠	ماء مقطر

إخلط السابق ثم أضف إليه الآتى :

مل	١	أيدرو أكسيد صوديوم ١%
مل	٢	فورمالين ٤٠%

يجب أن يكون الـ pH النهائى للمحلول السابق ٥,٥ - ٨,١

محلول ب

جرام	٢	نترات فضه
------	---	-----------

١٠٠ مل

ماء مقطر

أذب نترات الفضة ثم احتفظ به ١٠ مل . ثم اصف إلى
الـ ٩٠ مل الباقيه أيدروأكسيد الأمونيوم نقطه نقطه حتى
يتكون راسب .

أستمر فى إضافة أيدروكسيد الأمونيوم نقطه نقطه حتى
يزول الراسب ثم توقف عن الإضافه .

ثم أصف محلول نترات الفضة (١٠ مل المحتفظ بها)
إلى المحلول الرئيسى نقطه نقطه حتى تتكون عكاره خفيفه
 . أختبر pH والذي يجب أن يكون من ٨ , ٩ - ١٠ .

يجب إجراء الصبغ فى خلال ٤ ساعات من تحضير
الصبغه .

صبغة الجراثيم

طريقة Schaeffer and Fulton المعدلة

محلول أخضر المالاكيت

٥ جرام

أخضر المالاكيت

١٠٠ مل

ماء مقطر

محلول سفرانين

٥ , جرام

سفرانين

١٠٠ مل

ماء مقطر

صبغة المقاومه للحماض

طريقة Ziehl and Neelsen

كربول الفوكسين

محلول أ

جرام	٣	فوكسين قاعدى
مل	١٠	كحول ايثايل ٩٥%
		محلول ب
جرام	٥	فينول
مل	٩٥	ماء مقطر

ثم أخلط محلول أ إلى محلول ب تدريجيا مع التقليب . ثم يرشح المخلوط خلال ورقة ترشيح قبل الاستعمال .

كحول حامضى

مل	٩٧	كحول ايثايل ٩٥%
مل	٣	حامض يد كل مركز

أزرق ميثيلين

مثل التحضير السابق

صبغة جرام

طريقة Huc ker

صبغة الكريستال البنفسجية

محلول أ

جرام	٤	كريستال بنفسجى
مل	٢٠	كحول ايثايل ٩٥%
		محلول ب
جرام	٨	أكسالات أمونيوم
مل	٨٠	ماء مقطر

إخلط محلول أ ، ب بكميات متساويه . ويفضل تخفيف المحلول (أ) عشر مرات على ان يخلط ٢٠ مل من

المحلول بكمية مساوية من المحلول (ب) .

محلول اليود

يود	١	جرام
يوديد بوتاسيوم	٢	جرام
ماء مقطر	٣٠٠	مل

إصحن اليود ويوديد البوتاسيوم فى هاون ثم يذاب فى الماء . يحفظ المحلول فى زجاجات ملونه .

الصبغة العكسية

سفرانين	٢٥	جرام
كحول ٩٥%	١٠	مل
ماء مقطر	١٠٠	مل

أذب السفرانين فى الكحول ثم اصف الماء ورشح .

صبغة الغلاف

طريقة Anthony

صبغة الكريستال البنفسجى

كريستال بنفسجى	١	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مل

محلول كبريتات نحاس

كبريتات نحاس	٢٠	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مل

صبغة فونتانا

مثبت فونتانا

١	مل
---	----

حمض خليك ثلجى

٢	مل	فورمالين
١٠٠	مل	ماء مقطر
معمق فونتانا		
٥	جرام	حمض تانيك
١٠٠	مل	ماء مقطر

محلول فضة فونتانا

- ١- يذاب ٥ جرام نترات فضة في ١٠٠ مل ماء مقطر.
- ٢- خفف ٥ مل من محلول أمونيا مركزة بـ ٤٥ مل ماء مقطر .
- ٣- خذ ٩٠ مل من محلول نترات الفضة وأضف إليه ٢٥ مل من محلول مخفف من الأمونيا .
- ٤- استمر في اضافة الأمونيا نقطة نقطة حتى يذوب الراسب المتكون .
- ٥- أضف محلول نترات الفضة (١٠ مل المحتفظ بها) إلى المحلول الرئيسي نقطة نقطة حتى تتكون عكارة خفيفة .

نجروسين

١	جرام	نجروسين
١٠٠	مل	ماء مقطر

ملحق ٣

المحاليل

احمر الميثيل

أحمر ميثيل	١	جرام
كحول ايثايل ٩٥%	٢٥٠	مل
ماء مقطر	٢٥٠	مل
أذب أحمر الميثيل فى الكحول ثم أضف الماء المقطر ورشح .		

الفانفتايل امين

الفانفتايل امين	٥	جرام
حامض كبريتيك مركز	٨	مل
ماء مقطر	١	لتر
أضف حامض الكبريتيك إلى الماء المقطر ثم أضف الالفانفتايل أمين وقلب حتى يتم الذوبان .		

باريت أ

الفانفتول	٦	جرام
كحول ايثايل ٩٥%	١٠٠	مل

باريت ب

ايدروأكسيد بوتاسيوم	١٦	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مل

حمض بوريك ٢ , جزيئى

بللورات حمض بوريك	١٢ ,٤	جرام
ماء مقطر حتى يصل الحجم إلى	١٠٠٠	مل

حمض ستريك ١ , جزيئي

حمض ستريك
٢١ جرام
١٠٠٠ مل ماء مقطر حتى يصل إلى

حمض سلفانيك

حمض سلفانيك
٨ جرام
٤٨ مل
١٠٠٠ مل حمض كبريتيك مركز
ماء مقطر حتى يصل إلى

أضف حمض الكبريتيك إلى ٥٠٠ مل ماء مقطر . ثم
اضف حمض سلفانيك ثم ماء مقطر ليصل الحجم
إلى ١٠٠٠ مل .

فوسفات ثنائية البوتاسيوم ٢ , جزيئي

فوسفات ثنائية البوتاسيوم
٣٤ , ٩ جرام
١٠٠٠ مل ماء مقطر حتى يصل إلى

كوفاك

بارا - داي ميثيل - أمينو - بنزالدهيد
٥ جرام
٧٥ مل
٢٥ مل كحول ايميل أو بيوتائل
حمض يد كل مركز

مزيج فاسبار

فازلين
١ جزء
شمع بارافين
١ جزء

مزيج لهضم البروتينات

حمض كبريتيك مركز
٥٠٠ مل
٧٥ جرام
كبريتات صوديوم

٢ جرام	سلينايت النحاس
٥٠٠ مل	ماء مقطر
	منظم فوسفاتى
	محلول أ
٩٠٧٨ جرام	فوسفات أحادية البوتاسيوم
١٠٠ مل	ماء مقطر
	محلول ب
٩٤٦٥ جرام	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
١٠٠ مل	ماء مقطر

أخلط ١, ٦١ من المحلول ب مع ٩, ٣٨ مل من المحلول
أ ($pH = ٧$) .

نسلر

أذب ٥, ٦٢ جرام من يوديد البوتاسيوم فى ٢٥٠ مل ماء
مقطر أحتفظ بـ ١٠ مل من هذا المحلول . أضف إلى الجزء
الرئيسى من المحلول السابق بالتدريج محلول مشبع مبرد
من كلوريد الزئبق مع التقليب المستمر حتى يتكون راسب
دائم . أضف محلول يوديد البوتاسيوم (١٠ مل المحتفظ بها)
وكميات اضافيه من كلوريد الزئبق حتى يتكون راسب
أحمر فاتح .

أذب ١٥٠ جرام من ايدرو أكسيد البوتاسيوم فى ١٥٠ مل
ماء مقطر . برد المحلول ثم يضاف إلى المحلول السابق .
خفف إلى أن يصل الحجم إلى لتر بالماء المقطر . أترك
المحلول لمدة أسبوع وخذ الرائق للاستعمال .

يود مركز

يود	١٥	جرام
يوديد بوتاسيوم	٧٥	جرام
ماء مقطر	٢٢٥	مل

اصحن اليود و يوديد البوتاسيوم فى هاون ثم يذاب فى الماء . يحفظ المحلول فى زجاجات ملونة .

المراجع

- أبو الذهب (مصطفى كمال) ١٩٦٥ - البكتيريا - دار المعارف (٧٣٣ صفحة)
 سليم (محمود) ، طه (صلاح الدين) - ١٩٥٣ - البكتيريولوجيا العلمية . الطبعة الثانية - مطبعة العلوم بالقاهرة (١٧٤ صفحة) .
 شحاتة (أحمد محمد التابعى) ، عبد الغفار (أحمد صبرى) ، أبو الذهب (مصطفى كمال) ،
 الراكشى (سعد الدين) - ١٩٦٢ - الأساسيات العلمية فى علوم الأحياء الدقيقة . عام وتطبيقي - دار المعارف بمصر (٣١٠ صفحة) .
 فكرى (محمد عزيز) - ١٩٦٩ - الميكروسكوب ، استعماله فى الفحص البيولوجى - الهيئة العامة للكتب والأجهزة العلمية (٢٤٧ صفحة) .

- Baker , F. J 1662 . Handbook of Bacteriological Technique . Butterworths ,London 369p.
 Blendon , D C. and H.S. Goldberg . 1995. Silver impregnation stain for *leptospira* and flagella . J. Bact. 89: 899-900 .
 Braun, W.1953. Bacterial Genetics, W.B . Saunders Company . Philadelphia - London 288p
 Clifton, C E. 1958. Introduction to the Bacteria. Mc. Graw- Hill Book Company, Inc.New York, Toronto, London .558p.
 Collins, C.H. and C.E.D. Taylor. 1969. Microbiological Methods. 2nd Ed. Butterworths, London. 404p.
 Cruickshank, R. 1960. Mackie & McCartney's Handbook of Bacteriology Tenth Edition. E. & s. Livingston Limited Edinburgh and London. 980p.
 De Vay, JE. and W.C Schnathorst. 1963. Single cell isolation and preservation of bacterial cultures. Nature 199 : 775-777 .
 Dixon, M.and E.C. Webe 1967. Enzymes. 2nd Ed. Longmans 950. p. 56 : 815 - 849
 Hunwicke. 1931. The Essentials of Bacteriological Technique. Williams and Norgate. LTD. 108 p.

- Johansen D.A. 1940. Plant Microtechnique. Mc Graw Hill Book Company. New York and London, 523 p.
- Johnson. L.F. , E.A. , Curl, S.H. Bond, and H.A. Fribourg , 1960. Methods for Studying Soil Microflora - Plant Disease Relations . Burgess Publishing Company. Minneapolis 15 , Minn. 178 p.
- Kleiner ; I.S. and J.M. Orten. 1962. Biochemistry. Sixth Ed. The C.V. Mosby Company. St. Louis, 867 p.
- Lord, T.H. 1959. Determinative Bacteriology - Laboratory Manual. Burgess Publishing Co, Minneapolis 15-Minn 84 p.
- Mackie, T.S. and J.E. McCartney. 1945. Handbook of Practical Bacteriology. Seventh Ed. E. and S. Livingston, L.T.D. Edinburgh.
- Pelczar, M.J.(J.R.,) P.A.Hansen, and W.A. Konetzka. 1955. Quantitative Bacterial Physiology, Laboratory Experiments. Burgess Publishing Co. Minneapolis 15-Minn,149 p.
- Salle , A.J. 1948, Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology , Third Edition Mc Graw - hill Book Company. New York - Toronto - London 176. p. Publishing Co. Minnesota. 246 p.
- Schoenhard, D.E. 1962. Basic Concepts and Experiments in Microbiology Burgess
- Slack, J.M., J.E. Dyson, and W.K. Harrell. 1960. Experimental Pathogenic Microbiology. Burgess Publishing Company., Minneapolis 15, Minn. 146p.
- Society of The American Bactriologists. Committee on Bacteriological Technique. 1946. Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria. Geneva, N. Y. Loose Leaf
- Stanier,R.Y., M. Doudoroff and E.A. Adelberg. 1972. General Microbiology. Third edition. The Macmillan, London, N.Y.873.
- Sykes, G. 1958. Disinfection and Sterilization. E. and F.N. Spon. Ltd London. 393. p.
- Thimann, K.V. 1961 The Life of Bacteria. The Macmillan Company, New York.775 p.
- United States Department of Agriculture. 1965 Proceedings of the Firsst Workshop on Phytobacteriology . University of Missouri. Columbia, Missouri. 91. p.
- Wedberg. S.E. 1966 . Introduction to Microbiology. Reinhold Publishing Corporation, New York . 426. p.
- Wilson, G.S. and A.A. Miles. 1964 Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Volume I.Fifth Edition, Edward Arnold (Pubgishers) LTD. London, 1191 p.

طبع بمطابع دار المعارف

البكتيريا كائنات حية دقيقة غالبيتها مفيد للإنسان والقليل منها ضار يسبب أمراضا تهدد حياة الإنسان والحيوان والنبات وهي تعيش ملازمة للكائنات الأكثر رقيا ، ولم تكتشف إلا فى بداية القرن السابع عشر عند اكتشاف الميكروسكوب.

وهذه الكائنات تعيش فى مجاميع شأنها شأن الكائنات الحية الأخرى ، فهي تخضع لقوانين المجتمعات، وخاصة المنحنى الطبيعى للنمو. وكانت البكتيريا أول كائنات استعملت فى التجارب الخاصة بالجينات الوراثة التى عزل منها الكروموسوم بأكمله أو أجزاء منه أو مكوناته من خلية إلى أخرى للحصول على تركيبات وراثية جديدة ، وعلى ضوء هذه النتائج وضعت مبادئ ما هو معروف الآن بالهندسة الوراثية.

ويشتمل الجزء الأول من هذا الكتاب على دراسات مفصلة عن شتى نواحي علم البكتيريا كما أنه يحتوى على أحدث النتائج وأحدث نظم تقسيم وتصنيف البكتيريا. أما الجزء الثانى فقد اشتمل على الاختبارات الأساسية التى تتطلبها دراسة هذا العلم تطبيقا لما جاء فى الجزء الأول من نظريات ومعلومات ، كما اشتمل على اختبارات متخصصة فى المجالات التطبيقية المختلفة من هذا العلم.



دارالمعارف

١٠٥٤٠٧/٠٢



Bibliotheca Alexandrina



1032643